

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II**



**TESIS DOCTORAL**

**Papel de la señalización de HGF-MET sobre la migración e  
invasión de células ovaes**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Amileth Suárez Causado**

Directora

**Aránzazu Sánchez Muñoz**

**Madrid, 2012**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR II**



**PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN DE HGF/MET  
SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE  
CÉLULAS OVALES**

**TESIS DOCTORAL**

**AMILETH SUAREZ CAUSADO  
Madrid, 2012**





El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Amileth Suárez Causado, bajo la dirección de la **Dra. Aránzazu Sánchez Muñoz** en El Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia

**Opta al grado de Doctor**

Amileth Suárez Causado

Vº Bº de la Directora de tesis

Dra. Aránzazu Sánchez Muñoz



La autora ha disfrutado de una beca alban “Becas de Alto Nivel de la Unión europea para America Latina” y de un contrato de apoyo a la investigación Asociado al Proyecto SAF2009-12477.

La financiación para la realización de este trabajo se ha obtenido de los siguientes proyectos:

- MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. Ref: SAF2006-12025
- MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN Ref: SAF2009-12477



## **AGRADECIMIENTOS**





**A Diana Amileth**



## **ABREVIATURAS**



<b>2-AAF</b>	<i>2-acetilaminofluoreno</i>
<b>AKT</b>	<i>AK strain Transforming;v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
<b>BSA</b>	<i>Albúmina Sérica Bovina</i>
<b>CBL</b>	<i>Casitas B-lineage Lymphoma</i>
<b>CDE</b>	<i>Choline-Deficient, Ethionine-Supplemented</i>
<b>CK</b>	<i>Citoqueratina</i>
<b>Crk/CRKL</b>	<i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i>
<b>DDC</b>	<i>3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dubelco Modified Eagle Medium</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxiribonucleic acid</i>
<b>ECM</b>	<i>Extracellular matrix</i>
<b>EDTA</b>	<i>Etilendiaminotetraacetat sodico</i>
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>EMT</b>	<i>Epithelial to mesenchymal transition</i>
<b>EpCAM</b>	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
<b>FBS</b>	<i>Suero Fetal Bovino</i>
<b>FGF</b>	<i>Fibroblast growth factor</i>
<b>Gab-1</b>	<i>Grb-2-associated binding protein 1</i>
<b>Grb-2</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>HCC</b>	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<i>Interferon gamma</i>
<b>IL-6</b>	<i>Interleukin 6</i>
<b>JAM</b>	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
<b>JNKs</b>	<i>c-Jun N-terminal Kinases</i>
<b>Lt<math>\beta</math></b>	<i>Linfotoxina beta</i>
<b>MAGUK</b>	<i>Membrane Associated Guanylate Kinase</i>
<b>MAPKS</b>	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
<b>MBD</b>	<i>Met binding domain</i>
<b>MDCK</b>	<i>Mardin-Darby Canine Kidney</i>
<b>MMP1</b>	<i>Matrix metalloproteinase 1</i>
<b>MTOC</b>	<i>MicroTubule Organizing Center.</i>
<b>N- WASP</b>	<i>Wiskott–Aldrich Syndrome protein</i>
<b>NF-K<math>\beta</math></b>	<i>Nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
<b>PAR</b>	<i>partitioning –defective-1</i>

<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived growth factor</i>
<b>PH</b>	<i>hepatectomía parcial</i>
<b>PH</b>	<i>Pleckstrin homology</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<b>PIP3</b>	<i>phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate</i>
<b>PKC</b>	<i>Protein Kinase C</i>
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	<i>Phospholipase C-gamma</i>
<b>PTB</b>	<i>Phosphotyrosine binding</i>
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and TENSin homologue</i>
<b>Q-RTPCR</b>	<i>Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
<b>Rac1</b>	<i>RAs-related C3 botulinum toxin</i>
<b>Rap1</b>	<i>RAs-related Protein</i>
<b>rasGAP</b>	<i>ras guanosine triphosphatase activating protein</i>
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<b>SDF-1</b>	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
<b>SDS</b>	<i>Dodecil Sodium sulphate</i>
<b>SH2</b>	<i>de SH2 phosphate containing inositol 5'- Phosphatase</i>
<b>SHC</b>	<i>Src homology 2 domain containing transforming protein</i>
<b>SHP1</b>	<i>SH2 inositol 5-phosphatase 1</i>
<b>SHP2</b>	<i>Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase</i>
<b>siRNA</b>	<i>Short Interferente Ribonucleic Acid</i>
<b>SOS</b>	<i>Son of sevenless</i>
<b>STAT-3</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	<i>Transforming Growth Factor-alpha</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
<b>TPR</b>	<i>De translocated promoter region</i>
<b>TWEAK</b>	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
<b>ZO-1</b>	<i>Zonula Occludens-1 protein</i>

## ÍNDICE





## **AGRADECIMIENTOS**

## **ABREVIATURAS**

<b>I</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>3</b>
1.	EL HÍGADO	3
2.	CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS ADULTAS: CÉLULAS OVALES	6
	2.1 Descubrimiento y función en el hígado	6
	2.2 Origen y fenotipo.	9
	2.3 Factores que regulan la función de las células ovas	11
3.	POLARIDAD EN CÉLULAS EPITELIALES	13
4.	MIGRACIÓN CELULAR	16
	4.1 Ciclo de la migración	16
	4.1.1 Inicio de la migración: polarización	16
	4.1.2 Formación de protrusiones	17
	4.1.3 Retracción	18
	4. 2 Migración colectiva	18
5.	TRASICIÓN EPITELIO- MESÉNQUIMA	21
	5.1 Clases de EMT	22
	5.2 EMT Clase 1: EMT durante el desarrollo embrionario	23
	5.3 EMT Clase 2: EMT asociada a la regeneración tisular y la fibrosis	23
	5.4 EMT Clase 3: EMT asociada con la progresión tumoral y metástasis	24
	5.5 Regulación transcripcional de la EMT	24
6.	FACTOR DE CRECIMIENTO HEPÁTICO (HGF) Y SU RECEPTOR MET	26
	6.1 Expresión, síntesis y estructura del HGF.	26
	6.2 Activación del HGF	27
	6.3 Expresión, síntesis y estructura de c-Met.	29
	6.4 Activación de Met	31
7.	SEÑALIZACIÓN Y REGULACION DE LA SEÑALIZACION HGF/Met	34
	7.1 Señalización intracelular	34
	7.2 La cascada MAPK	35
	7.3 La vía PI3K-AKT	37
	7.4 La vía STAT-3	38
	7.5 Complejo IκBα–NF-κB	38
	7.6 Regulación de los niveles de Met	39
8.	ACTIVIDADES BIOLÓGICAS INDUCIDAS POR HGF/MET	41
	8.1 HGF/Met y el hígado	41
	8.2 HGF/Met y su papel en regeneración de tejidos	42
	8.3 HGF/Met y su papel en la respuesta morfogénica.	43
	8.4 HGF/Met y motilidad celular	45
	8.5 HGF/Met y cáncer	46

9.	RESULTADOS PUBLICADOS DEL GRUPO RELATIVOS AL MODELO CELULAR UTILIZADO EN ESTE ESTUDIO	46
<b>II</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>49</b>
<b>III</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>53</b>
1.	CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES	55
	1.1 Condiciones del cultivo	55
	1.2 Factores de crecimiento e inhibidores utilizados	56
2.	ENSAYOS DE “SCATTER” O DISPERSIÓN CELULAR	56
	2.1 Video-microscopía del ensayo de “scatter”	56
3.	ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE CICATRIZACIÓN O CIERRE DE HERIDA ( <i>WOUND HEALING</i> ).)	57
4.	ENSAYOS <i>IN VITRO</i> DE MIGRACIÓN E INVASIÓN	57
	4.1 Pretratamiento de los insertos para los experimentos de migración/invasión	58
	4.2 Fijación y tinción de filtros para el análisis cuantitativo	59
5.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-PCR ( <i>REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION</i> )	59
	5.1 La síntesis de cDNA	59
	5.2 Amplificación del cDNA por PCR	60
6.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE QRT-PCR (QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION)	61
7.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y ECM UTILIZANDO ARRAYS DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR CUANTITATIVA	62
	7.1 Amplificación del cDNA	63
8.	SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA	64
9.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOT</i>	65
10.	ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN	68
11.	ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS: ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA	69
12.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70

<b>IV</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
1.	EL HGF PROMUEVE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN EN CÉLULAS OVALES CON UN RECEPTOR c-MET FUNCIONAL (MET <sup>flx/flx</sup> )	73
1.1.	El HGF no induce dispersión, pero promueve la migración y reorganización de células ovas <i>in vitro</i> .	73
1.2.	El HGF promueve la migración e invasión <i>in vitro</i> de células ovas Met <sup>flx/flx</sup> a través de matriz extracelular	75
1.3.	El HGF favorece el proceso migratorio dirigido al cierre de herida en células ovas	77
2.	CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR DEL EFECTO MOTOGÉNICO Y PRO-INVASIVO INDUCIDO POR HGF EN CÉLULAS OVALES	79
2.1.	El HGF favorece la reorganización del citoesqueleto de actina	79
2.2.	El HGF altera las uniones célula-célula	80
2.3.	El fenotipo migratorio inducido por HGF no está asociado a un proceso de EMT	83
2.3.1	El HGF no induce la adquisición de una morfología de célula mesenquimática en células ovas	83
2.3.2	El HGF no induce la expresión de Snail ni modula los niveles de expresión de E-cadherina en células ovas	84
2.4.	El HGF promueve la migración polarizada de las células ovas	86
3.	ANÁLISIS DEL EFECTO DE HGF SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE LOS HEPATOCITOS	89
3.1.	El HGF no promueve la dispersión, pero sí la migración e invasión <i>in vitro</i> de hepatocitos neonatales, a través de matriz extracelular.	89
3.2.	El HGF favorece el proceso migratorio dirigido al cierre de herida en hepatocitos	90
3.3.	El fenotipo migratorio inducido por HGF en hepatocitos no está asociado a un proceso de EMT, ni a la relocalización de ZO-1, ni a la compactación del Golgi	91
4.	ESTUDIO DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN QUE MEDIAN LOS PROCESOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN INDUCIDOS POR HGF EN CÉLULAS OVALES	93
4.1.	Las vías de señalización de PI3K y p38 contribuyen a la migración/invasión de células ovas a través de colágeno IV, inducida por HGF	93
4.2.	Las vías de señalización de PI3K y ERK1/2 MAPKs contribuyen a la migración/invasión de células ovas a través de matrigel, inducida por HGF	95

4.3. La vía de señalización de PI3K y ERK1/2 MAPKs contribuyen al incremento inducido por HGF de la capacidad de las células ovas para migrar de forma dirigida hacia el cierre de herida	96
4.4. Efecto del silenciamiento de la subunidad reguladora (p85) de PI3K sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células ovas	97
5. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR HGF DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR	100
<b>V DISCUSION</b>	105
<b>VI CONCLUSIONES</b>	121
<b>VII BIBLIOGRAFIA</b>	125
<b>ANEXO I.</b> Tabla de los genes utilizados en el <i>array</i> de Moléculas de Adhesión y Matriz Extracelular	145

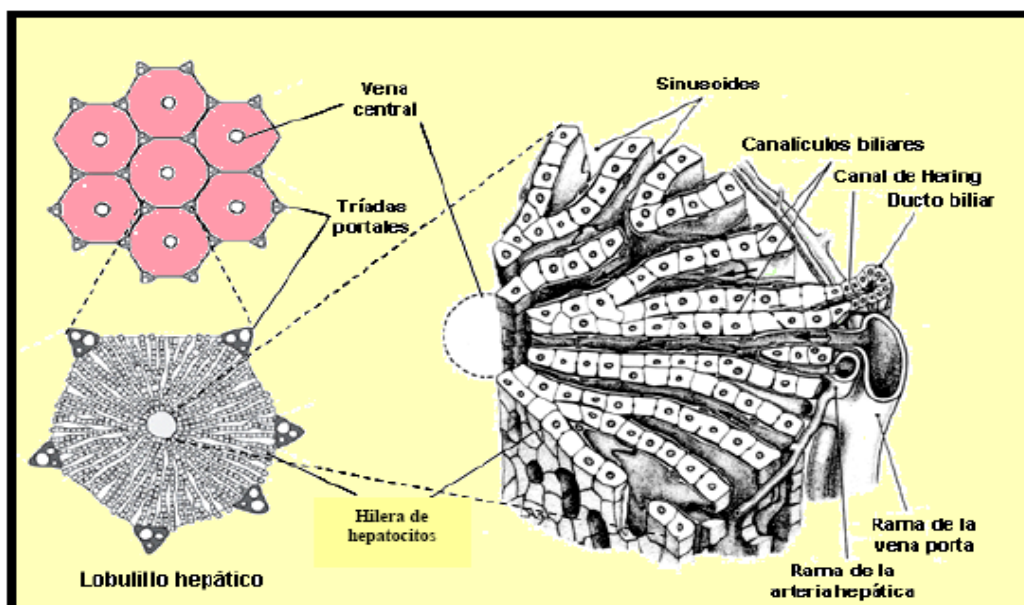
# **I. INTRODUCCIÓN**



## 1. EL HÍGADO

El hígado es uno de los órganos de mayor tamaño y complejidad metabólica de los mamíferos. Posee un papel tanto exocrino como endocrino y desempeña múltiples funciones esenciales para la homeostasis del organismo (revisado por Desmet, 2001). Dichas funciones incluyen: la síntesis de proteínas plasmáticas, la eliminación e hidrólisis de proteínas séricas, eritrocitos y microbios; la producción y catabolismo de la glucosa según las necesidades del organismo, así como de ácidos grasos y triglicéridos; el almacenamiento de glucógeno, vitaminas (A, B12) y minerales (hierro y cobre), el mantenimiento de los niveles de colesterol, la síntesis de aminoácidos no esenciales, además de la producción y excreción de componentes de la bilis. Asimismo, durante el desarrollo fetal, el hígado asume la función hematopoyética, debido a que las células madre sanguíneas migran del saco vitelino al hígado en desarrollo, donde desempeñan su función.

El hígado está formado por lobulillos hepáticos. Son estructuras hexagonales formadas por hileras de hepatocitos de una o dos células de grosor, en cuyo centro se encuentra la vena central, que desemboca en las venas hepáticas y éstas a su vez en la vena cava inferior [(revisado por (Malarkey et al. 2005))(Figura. 1).



**Figura 1. Estructura del lobulillo hepático (Adaptado de Fausto et al., 2003 y Spear et al., 2006).**

La unidad estructural básica del hígado es el lobulillo hepático mientras que se denomina acino hepático a la unidad funcional básica [(revisado por (Malarkey et al. 2005)]. El acino hepático se define como una estructura oval, cuyo eje gira en torno a la vena porta y se delimita por las venas centrales de los lobulillos hepáticos adyacentes. Así, se distinguen tres



zonas dentro del hígado, debido a la disminución de aporte de oxígeno y de nutrientes conforme la sangre fluye desde la triada portal hacia la vena central, que dan origen a diferencias en la especialización de los hepatocitos. Esta especialización se origina mediante la expresión diferencial de factores de transcripción y vías de señalización dependientes de la presión de oxígeno (Jungermann and Kietzmann 2000).

El hígado adulto se compone de diferentes poblaciones celulares (Grisham 1983; Malarkey et al. 2005). Los hepatocitos son células epiteliales que se organizan formando parénquimas representan el 60% del número total de células en el hígado y son la población mayoritaria [(revisado por (Spear et al. 2006)]. Según su localización en las placas, los hepatocitos son distintos. El 20-25% ubicados cerca del tracto portal son más pequeños, diploides y con capacidad proliferativa (Kano et al. 2008). A medida que se acercan a la vena central, van aumentando su tamaño y o su ploidía, variando sus marcadores de diferenciación, y disminuyendo su potencial de proliferación; la mayoría son tetraploides (mononucleares o binucleares con 2 núcleos diploides) [(revisado por (Fausto and Campbell 2003)].

Los hepatocitos son células epiteliales que en consecuencia presentan como filamentos intermedios las citoqueratinas (CK8 y CK18) y y debido a la función que desempeñan en la síntesis de proteínas plasmáticas expresan también albúmina y fibrinógeno, lo cual permite la identificación de este tipo celular. Sus caras son diferentes, dependiendo de si conectan con otros hepatocitos, si forman el canalículo biliar o si están en contacto con el espacio sinusoidal. Así la célula hepática está estructural y funcionalmente polarizada, con tres tipos de membrana: lateral, canalicular o apical y sinusoidal o basal. El mantenimiento de la polaridad es esencial para la función del hepatocito y viene determinada por las uniones intercelulares (tipo intermedio, desmosomas y de tipo *gap*), por los diferentes receptores para proteínas de la matriz extracelular y por la presencia de factores de crecimiento.

Entre las hileras de hepatocitos hay canalículos biliares que se orientan del centro del lobulillo hacia la periferia donde desembocan en el canal de Hering, que confluye en los ductos biliares del espacio portal. Cabe destacar que el canal de Hering es la zona donde se cree que residen las células progenitoras hepáticas. Los ductos biliares se encuentran tapizados por las denominadas células de los ductos biliares o colangiocitos [(Haraguchi et al.) 2010)].

En el hígado se encuentran otros tipos celulares como las células sinusoidales que incluyen las células endoteliales, las células estrelladas y las células de Kupffer (figura.2). Las células estrelladas, también denominadas células de Ito o lipocitos son células mesenquimáticas y tienen un papel muy importante en la fisiología de las células hepáticas debido a que son las

células que producen mayor cantidad de factores de crecimiento y de matriz extracelular [(revisado por (Malik et al. 2002)]. Asimismo, desempeñan un papel muy relevante en regeneración, fibrogénesis y cirrosis hepática. Las células de Kupffer son macrófagos hepáticos que se encargan de la eliminación de eritrocitos envejecidos, participan en la respuesta inmune y producen una gran variedad de citoquinas y quimioquinas [(revisado por (Spear et al. 2006)].

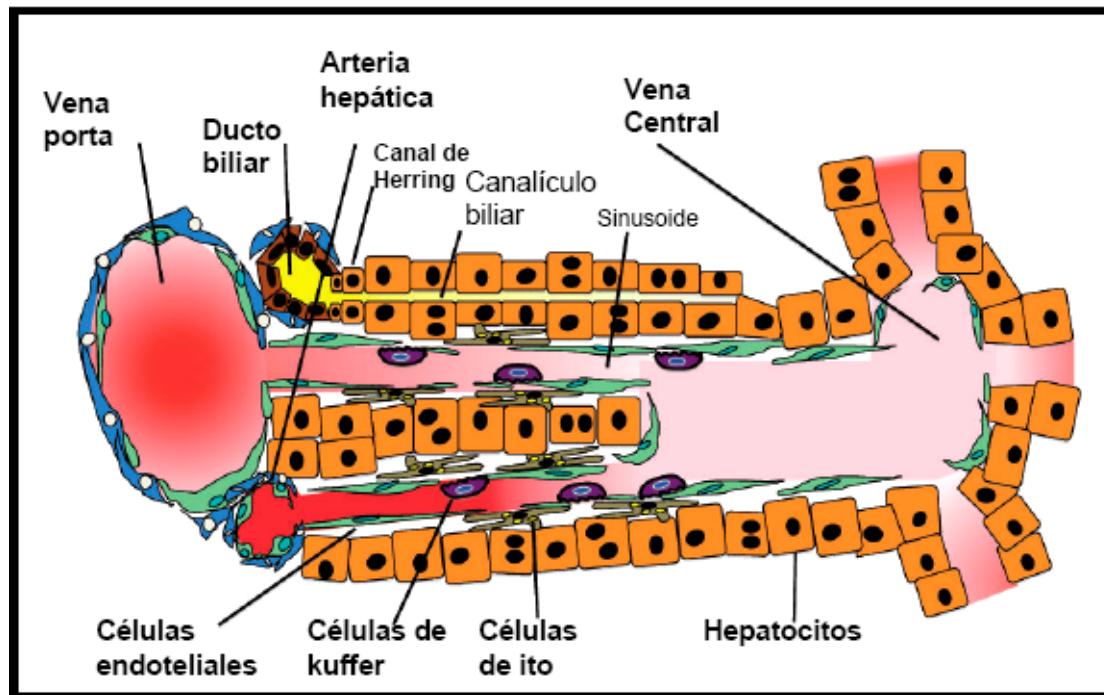


Figura 2. Estructura del hígado y poblaciones celulares.

La **matriz extracelular** tiene un papel muy importante, no sólo estructural sino también en la regulación y modulación de la función hepática. Entre el 5 y el 10% de la matriz está formada por colágeno, y también contiene metaloproteasas, diferentes glicoproteínas: laminina, fibronectina, vitronectina, undulina, nidógeno; y proteoglicanos como heparán sulfato [(revisado por (Malarkey et al. 2005)].

Cabe mencionar que en vertebrados adultos, la capacidad de regeneración está limitada a muy pocos tejidos, entre ellos el hígado. Aunque los hepatocitos adultos normalmente no se dividen, mantienen una gran capacidad proliferativa en respuesta a daño por agresión química, patógenos, xenobióticos y estrés inflamatorio. La capacidad de replicación de los hepatocitos en respuesta a estos daños hace posible la **regeneración de la masa hepática** incluso a partir de un bajo número de células (Sandgren et al. 1991; Overturf et al. 1997). Así, se ha podido observar tras la resección quirúrgica del 70% del hígado, es decir, tras una hepatectomía parcial en animales de investigación, las células remanentes restauran la celularidad y masa hepática completamente.

Las referencias a esta extraordinaria capacidad regenerativa del hígado se encuentran ya en la mitología Griega, reflejadas en el mito de Prometeo (*Tras robar el secreto del fuego a los dioses y entregárselo a los humanos, Prometeo fue condenado por Zeus a permanecer encadenado a una roca. Allí, Prometeo era torturado por un águila que se alimentaba de su hígado cada noche, estando el hígado de nuevo entero a la noche siguiente*). El estudio detallado del proceso regenerativo ha sido abordado científicamente usando aproximaciones moleculares y genéticas. El mejor modelo experimental para su estudio es la hepatectomía parcial (PH de *partial hepatectomy*) en roedores (Higgins y Anderson R.M., 1931).

Tras un PH, los hepatocitos normalmente quiescentes abandonan la fase G0 y entran en ciclo celular bajo la influencia de factores de crecimiento. Cada hepatocito sufre, de media, 1.4 rondas de replicación para restaurar el tamaño del hígado. Al cabo de 4 días, esta respuesta hiperplásica se reduce drásticamente y el posterior aumento de la masa hepática se consigue mediante hipertrofia de los hepatocitos. No solo los hepatocitos proliferan, también los colangiocitos y las células endoteliales también proliferan, lo que sirve para mantener las relaciones entre las distintas poblaciones celulares del hígado.

Ante la gran necesidad de buscar fuentes alternativas al **trasplante de órgano entero** surgen diversas alternativas como el **trasplante celular** (uno de los más prometedores actualmente) tanto de hepatocitos adultos diferenciados, como de células madre. Estas últimas muestran un futuro más esperanzador, gracias a la capacidad que tienen de diferenciarse en distintos tipos celulares dependiendo del entorno en el que se encuentren, por lo que constituirían un recurso inagotable de células hepáticas para trasplante y terapia génica.

## 2. CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS ADULTAS: CÉLULAS OVALES.

### 2.1 Descubrimiento y función en el hígado.

En los últimos años el interés por las células progenitoras hepáticas ha aumentado de forma considerable fundamentalmente por su potencial como herramienta terapéutica en diversas enfermedades del hígado, en particular como fuente celular alternativa al transplante de órgano completo, o al transplante de hepatocitos, ya que éstos constituyen soluciones muy limitantes debido a la escasez de donantes y la dificultad que presenta el cultivo de hepatocitos [(revisado por (Grompe 2005; Knight et al. 2005)].

Aunque existen varias fuentes de células progenitoras hepáticas, las células ovals son las más ampliamente estudiadas y conocidas. Se descubrieron por primera vez en 1937 (Kinosita 1937), pero fue 20 años después cuando se les dio el nombre de células ovals debido

a que poseen un núcleo de forma ovalada (Farber 1956). A pesar de su temprano descubrimiento, su relevancia en la fisiopatología hepática ha sido reconocida en las últimas dos décadas.

En condiciones normales, en el hígado, como en la mayoría de los órganos se mantiene un equilibrio entre la pérdida y la ganancia celular, que es llevado a cabo por la división de las propias células maduras, los hepatocitos y las células del ducto biliar [(revisado por Knight et al., 2005; Grompe, 2005)]. El recambio de hepatocitos en un hígado sano es lento, teniendo estos una vida media de aproximadamente un año. Como se ha comentado, el hígado tiene una gran capacidad regenerativa: por ejemplo en ratas, cuando se resecciona el 70% del hígado el remanente hepático alcanza de nuevo la masa original en aproximadamente 10 días [Revisado por (Michalopoulos), 2010 ]. Sin embargo, cuando la lesión en el hígado limita la proliferación y/o la funcionalidad de los hepatocitos, las células ovales son responsables de la reparación del parénquima dañado, jugando así una un papel crucial en la regeneración hepática. [Revisado por (Fausto and Campbell 2003; Knight et al. 2005; Santoni-Rugiu et al. 2005)]. De hecho, las células ovales más estudiadas derivan principalmente de modelos experimentales de regeneración hepática inducida en roedores por exposición a una variedad de agentes químicos y carcinógenos, solos o combinados con un tratamiento quirúrgico, la PH. Tabla I). Uno de los modelos más utilizado para caracterizar las células ovales en ratas es la PH con 2-acetilaminofluoreno, modelo 2-AAF/PH es decir, bloqueando la proliferación de hepatocitos por 2-AAF antes de PH (Evarts et al. 1987). Sin embargo, este procedimiento no induce la activación de células ovales en el ratón y como protocolo alternativo se utiliza de igual forma daño hepático (PH) y dieta deficiente en colina suplementada con etionina (CDE) o dieta con 3,5 dietoxicarbonil-1,4 dihidro-colina (DDC). (Akhurst et al. 2001; Wang et al. 2003).

En todos estos modelos se produce una severa necrosis hepatocelular acoplada a una aparente incapacidad de la población de hepatocitos remanente para proliferar. En su lugar, se observa la proliferación de unas células pequeñas en la zona periportal, en la región de los ductos biliares terminales, que presentan escaso citoplasma y un núcleo ovoide (las células ovales), que se expanden progresivamente por todo el parénquima hepático, diferenciándose posteriormente hacia hepatocitos y células del ducto biliar e integrándose finalmente en la arquitectura hepática provocando así la recuperación de la estructura hepática [revisado por (Newsome et al. 2004; Santoni-Rugiu et al. 2005; Knight et al. 2005)].

Los experimentos llevados a cabo para testar la capacidad de las células ovales para asentarse, integrarse en el parénquima hepático, proliferar y diferenciarse hacia hepatocitos tras su trasplante en el hígado han tenido un resultado positivo. Así, estas células son capaces de rescatar ratones con un fallo hepático causado por la delección homocigótica de la enzima

fumarilacetoacetato hidrolasa (ratones Fah  $-/-$ ), demostrando su funcionalidad (Wang et al. 2003).

Posteriormente, se ha descubierto que las células ovals no son exclusivas de los roedores. Se han identificado sus análogos en hígado humano, en una variedad de patologías tales como la hepatitis viral crónica, colestasis, hígado graso de etiología alcohólica y no alcohólica, cirrosis, hiperplasia nodular focal, focos displásicos, adenoma hepatocelular, hepatocarcinoma y colangiocarcinoma (Libbrecht and Roskams 2002; Roskams et al. 2003; Roskams 2006; Lee et al. 2006).

A estas células se las denomina hepatocitos ductulares o células intermedias hepatobiliares, reservando el término de célula oval para las procedentes de roedores. La detección de células con características de células ovals en lesiones tumorales en hígado humano, junto con las observaciones tempranas de la asociación estrecha entre la aparición de células ovals y lesiones preneoplásicas en el hígado, sugiere que estas células representan un precursor celular al carcinoma hepatocelular (HCC, de *hepatocellular carcinoma*). Otras observaciones que apoyan esta hipótesis son la formación de HCC y otros tumores por exposición de las células ovals a carcinógenos, así como la proliferación y acumulación de estas células bajo ciertos regímenes carcinógenicos (Sell 2002; Fang et al. 2004); o la capacidad de transformación de las células ovals *in vitro* (Pack et al. 1993; Dumble et al. 2002). Todas estas observaciones son hallazgos circunstanciales insuficientes para concluir que el HCC procede de células ovals transformadas, pero que ponen en evidencia la necesidad de conocer mejor los requerimientos de factores de crecimiento para la proliferación, diferenciación y supervivencia de estas células, y sus mecanismos de acción dentro de la célula, antes de que la aplicación terapéutica de hepatocitos derivados de células progenitoras se pueda convertir en una realidad.

**Tabla I. Modelos experimentales de activación de células ovals**

<b>Modelos experimentales de activación de células ovals</b>	
<b>Rata</b>	<b>Raton</b>
2-acetilaminofluoreno/ Hepatectomía parcial (2-AAF/PH)	2-acetilaminofluoreno/Hepatectomía parcial ( 2-AAF/PH)
CCl <sub>4</sub>	Dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (CDE)
Dieta deficiente en colina y suplementada con etionina (CDE )	Dietilnitrosamina (DEN)
3,3'-diaminobenzidine (3'-Me-DAB )	3,5-dietoxycarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC)
Galactosamina	Dipina
furano	Cocaina/ Fenobarbital

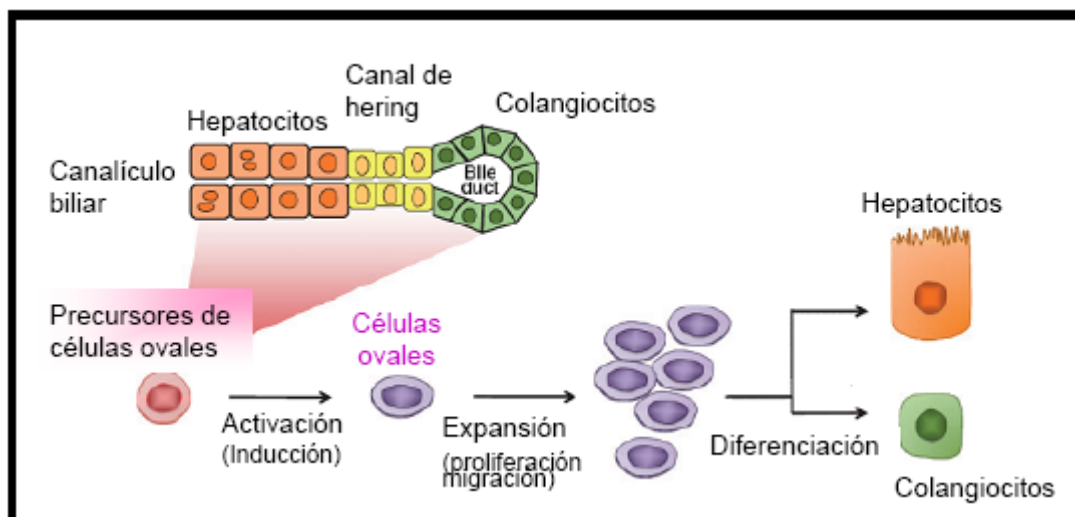
## 2.2 Origen y fenotipo.

El origen de las células ovals sigue siendo objeto de controversia, lo que no es de extrañar dado que son apenas detectables en el hígado sano y aparecen en el hígado dañado cuando la regeneración mediada por hepatocitos está inhibida. Estudios inmunohistoquímicos apuntan a que la población de células que da lugar a las células ovals se localiza en los canales de Hering, las ramificaciones más pequeñas del árbol biliar [revisado por (Shafritz et al. 2006)], existiendo también dicho nicho en hígados adultos humanos [revisado por (Santoni-Rugiu et al. 2005)]. Dicha localización ha hecho pensar que desciendan de una fuente celular endógena en el hígado. Una de las teorías más apoyada es que una subpoblación de hepatoblastos fetales (las células progenitoras hepáticas por excelencia), asentada allí durante el desarrollo y mantenida en estado latente durante la fase adulta, constituya el posible nicho de células ovals, debido no solo a su semejanza morfológica sino a que comparten marcadores fenotípicos y opciones de linaje. Además, la teoría de que las células ovals son derivadas de la región periportal, en particular de los canales de Hering esta sustentada en que, al activarse, las células ovals se expanden desde el parénquima del hígado hasta el área periportal y un daño selectivo de la zona periportal reduce la proliferación de las células ovals (Paku, et al 2001).

Otras teorías apoyan que las células ovals podrían provenir de hepatocitos desdiferenciados [(revisado por (Santoni-Rugiu et al. 2005; Viebahn and Yeoh 2008)]. Asimismo, existen evidencias que indican que las células del epitelio biliar pueden dar lugar a células ovals que a su vez se diferencian hacia hepatocitos cuando éstos no pueden proliferar. De la misma manera, se ha demostrado que los hepatocitos periportales pueden dar lugar a colangiocitos (Crosby et al. 1998; Michalopoulos et al. 2005). Estos datos han puesto en duda la existencia de una población de células progenitoras hepáticas permanente en el hígado,

sugiriendo que se podrían originar a partir de subpoblaciones de hepatocitos y células del ducto biliar (Figura.3).

Por último, otros investigadores han sugerido un origen exógeno para las células ovals dado que comparten marcadores con las células madre hematopoyéticas (Petersen et al. 1998; Shafritz et al. 2006), aunque esta teoría parece bastante improbable [(revisado por (Newsome et al. 2004; Matthews and Yeoh 2005; Santoni-Rugiu et al. 2005; Michalopoulos 2007; Viebahn and Yeoh 2008)].



**Figura 3. Esquema de los posibles orígenes de las células ovals. (Adaptación de Tanaka et al del 2011).**

Fenotípicamente, las células ovals son células inmaduras pequeñas (más o menos 10  $\mu\text{m}$ ), basófilas, con un citoplasma escaso y núcleo ovoide. Constituyen una población heterogénea, con una gran capacidad proliferativa y se sabe que al menos son bipotenciales, es decir, se pueden diferenciar tanto a hepatocitos como a células del epitelio biliar, habiéndose demostrado también su capacidad para dar lugar a varios linajes celulares no hepáticos, como células pancreáticas, del epitelio intestinal, y células glía [(revisado por (Zheng and Taniguchi 2003; Knight et al. 2005)].

La falta de marcadores específicos para la identificación y aislamiento de las células ovals ha sido un problema importante. Aún así, se reconoce que las células ovals expresan marcadores tanto de hepatocitos (albúmina, alfa-fetoproteína, citoqueratinas 8 y 18) como de colangiocitos (citoqueratina 19, A6, OV6, y gamma-glutamyl transpeptidasa) [(revisado por (Zheng and Taniguchi 2003)]. Además, expresan proteínas que forman parte de las uniones intercelulares de tipo gap, como las conexinas 26 y 43; y comparten marcadores con las células madre hematopoyéticas (c-kit, CD34, Thy-1, Flt-3) (Tabla II).

En aras de obtener una mejor caracterización, Dabeva y colaboradores describieron, en un modelo de rata 2 AAF/PH, la expresión de EpCAM (*Epithelial cell adhesion molecule*) en las células progenitoras bipotenciales en hígado adulto (Yovchev et al. 2007; Yovchev et al. 2008), aunque algunos estudios han demostrado que EpCAM se expresa tanto en colangiocitos de ratones normales como en células ovals. (Okabe et al. 2009). De hecho estos autores proponen como marcador exclusivo de células ovals, la proteína TROP2. Asimismo Susuki y colaboradores indicaron que las células que expresaban CD133, aisladas de hígados de ratones tratados con DDC, podrían formar grandes colonias en cultivos con propiedades bipotenciales, es decir capacidad para diferenciarse a hepatocitos y colangiocitos.

**TABLA II . Marcadores de Linaje Representativos de las Células Hepáticas en las Diferentes Etapas del Desarrollo.**

	HEPATOBLASTOS	CÉLULAS OVALES	COLANGIOCITO	HEPATOCITO
ALB	+	+	-	+
AFP	+	+	-	-
CK7	+	+	+	-
CK8	+	+	+	+
CK18	+	+	+	+
CK19	+	+	+	-
OV-6	+	+	+	-
A6	+	+	+	-
HES6	-	-	-	+
BD1	-	-	+	-
GGT	+	+	+	-
Thy-1	+	+	-	-
c-Kit	+	+	+/-	-
CD34	+	+	-	-
Met	+	+	+/-	+/-
Dlk	+	+	-	-
Cx43	+	+	+	-
Cx32	-	-	-	+

+:Positivas  
-:Negativas  
+/-:débilmente positivo o difícil de identificar

### 2.3 Factores que regulan la función de las células ovals.

Es bien sabido que el microambiente de señalización molecular, creado en el hígado por una determinada lesión, juega un papel fundamental en determinar las respuestas celulares y moleculares durante el proceso regenerativo. Las primeras señales para activar la regeneración en el hígado son las citoquinas que ante un daño crónico modulan la respuesta de la célula oval.

En concordancia con esta noción, se ha demostrado que varias citoquinas inflamatorias, como TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor-alpha*), linfotóxina beta (Lt $\beta$ ) o el interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) y IL-6 (*Interleukin 6*) modulan la respuesta de la célula oval. Estas citoquinas



inflamatorias son consideradas parte del sistema inmune detectándose en tejidos lesionados y sirven como primera señal para activar la regeneración del hígado.

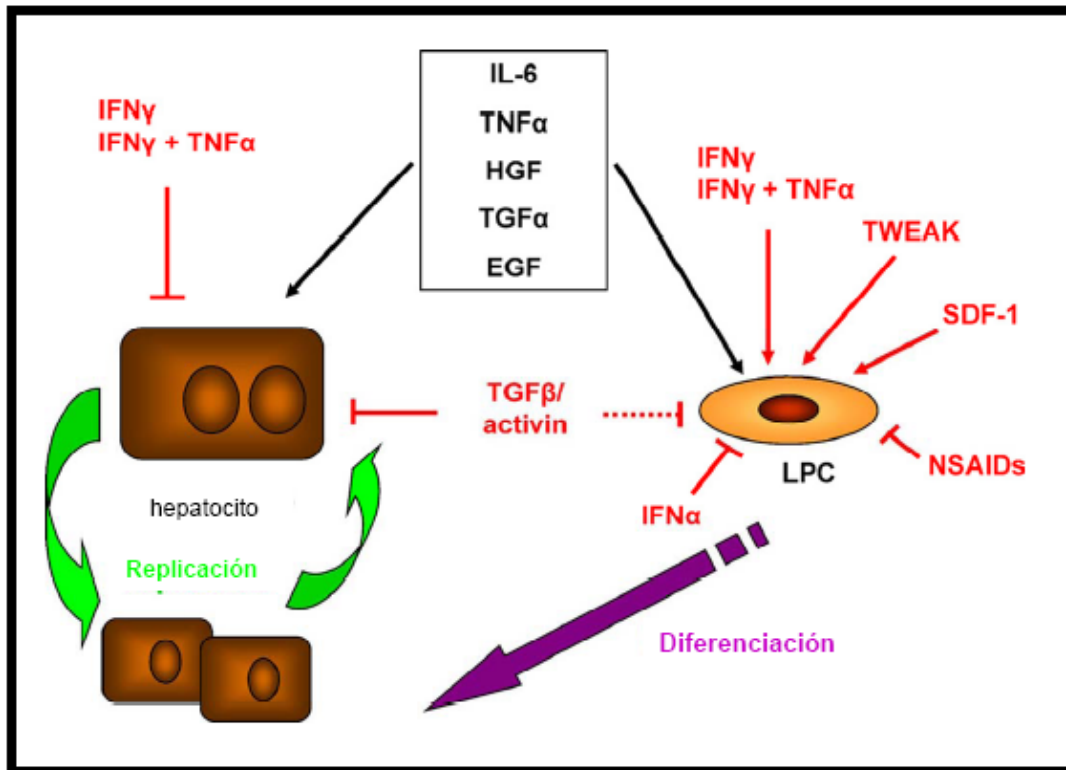
La citoquina mejor estudiada que participa en la respuesta de la célula oval es un miembro de la familia de ligando de TNF, TWEAK. Así, ratones transgénicos que sobreexpresan la citoquina en el hígado exhiben hiperplasia en la zona periportal de las células ovals, mientras que la administración de un anticuerpo monoclonal anti-Tweak reduce significativamente la respuesta proliferativa de la célula oval en ratones con dieta DDC (Jakubowski et al. 2005). Además, en ratones con delección de Fn14, (el receptor de Tweak) la inducción de la célula oval es atenuada en dieta con DDC y CDE [(Tirnitz-Parker et al.)2010)].

Se ha sugerido que células mesenquimales, como las células estrelladas, interactúan físicamente con las células ovals y, de este modo, se considera que inducen algunas señales en ellas (Paku et al. 2001). En modelos de rata y ratón se ha demostrado que una población de células mesenquimales, que expresan antígeno 1 de las células del timo (Thy-1 conocida también como CD90) residen cerca a las células ovals expandiéndose en paralelo (Yovchev et al. 2009). Además, estas células expresan también FGF7, mientras que su receptor, FGFR2b, es detectado en las células ovals. En este sentido, ratones deficientes para la proteína FGF7 muestran defectos en la respuesta de la célula oval, mientras que la sobre-expresión de FGF7 *in vivo* en ratones de hígado normal produce inducción y proliferación de células con marcadores de células ovals en el área periportal. De esta manera, FGF7 tiene un papel en la respuesta de las células progenitoras del hígado adulto. [revisado por (Tanaka et al.)2011].

Adicionalmente se ha sugerido que la quimioquina SDF-1 (*Stromal cell-derived factor 1*) muestra efectos estimuladores sobre las células ovals, así como también factores de crecimiento, tales como el HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor-alpha*) y EGF (*Epidermal Growth Factor*) y el TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-beta*) que se comporta como un factor inhibidor capaz de contrarrestar la respuesta regenerativa. Por otra parte, también han implicado a la vía canónica Wnt/b-catenina en la regulación de las células ovals (Figura. 4) (Hu et al. 2007; Apte et al. 2008; Yang et al. 2008; Itoh et al. 2009).

La mayoría de las señales anteriores intervienen en la modulación de la regeneración hepática mediada por hepatocitos es decir, en circunstancias donde no exista una lesión crónica, aunque algunas de éstas solo participan en la activación de la célula oval. Aún no se ha encontrado una explicación clara y definitiva a la activación diferencial de uno u otro compartimento celular. No se puede descartar que existan factores diferentes, aún sin identificar, que sean específicos de las células progenitoras y con capacidad de activar un compartimento e inhibir el otro de forma simultánea. De momento las evidencias parecen

apuntar a posibles diferencias en los programas celulares activados en respuesta a los mismos factores, que resultarían en diferentes respuestas celulares [(revisado por (Knight et al. 2005; Santoni-Rugiu et al. 2005; Viebahn and Yeoh 2008)].



**Figura 4. Factores que modulan la funcionalidad de los hepatocitos y la activación de las células progenitoras hepáticas.**

Entre todas estas señales reguladoras, hemos centrado nuestra atención en el sistema ligando-receptor de HGF/Met. La relevancia de esta ruta de señalización en el hígado y en particular en la regulación del compartimento de células progenitoras hepáticas se resume en uno de los capítulos de esta introducción.

### 3. POLARIDAD EN CÉLULAS EPITELIALES

La asimetría espacial o polaridad es una propiedad fundamental de las células epiteliales, y puede ser un fenómeno transitorio o una característica permanente (Figura. 5). La adquisición de polaridad celular es un mecanismo complejo por el que la célula establece y mantiene dominios en la membrana plasmática diferenciados funcionalmente y separados físicamente. Esta organización espacial y la composición diferente de estos dominios facilitan procesos celulares fundamentales y tan diversos como son la diferenciación, la interacción célula-célula, la secreción de moléculas, la función tisular, la inmunidad celular, la migración celular, el desarrollo y la morfogénesis.

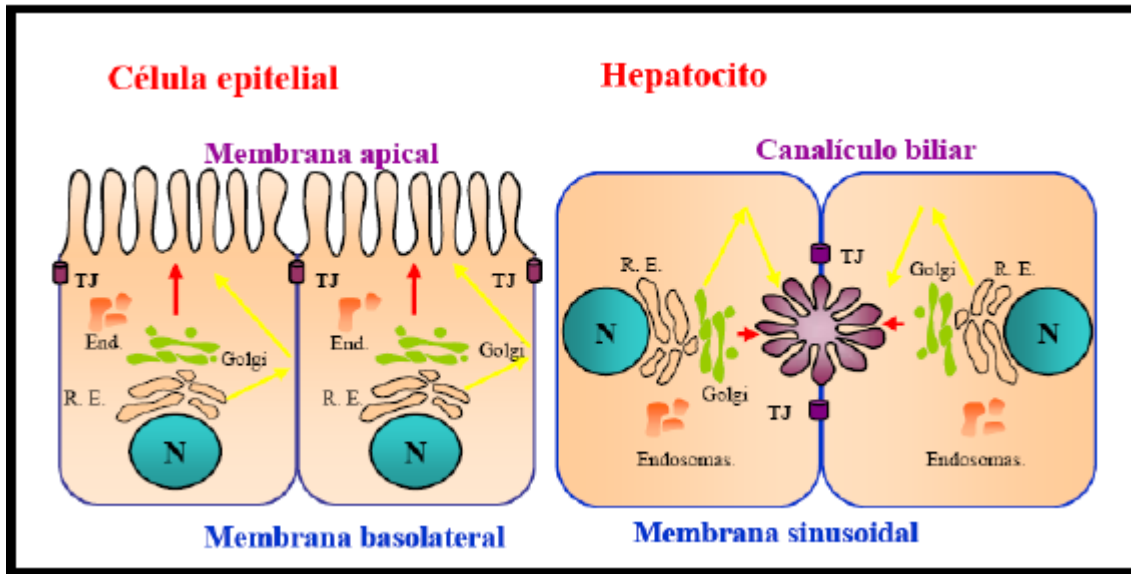


Figura 5. Modelos de células polarizadas: La célula epitelial y el hepatocito

Los epitelios constituyen una capa celular altamente organizada con funciones muy especializadas de secreción, absorción, transporte de iones y de barrera protectora. Para ejercer su función las células epiteliales en general y las hepáticas en particular diferencian su membrana plasmática en un subdominio apical que está en contacto con el lumen o el exterior celular y otro basolateral por el que se unen a las células vecinas y a la matriz extracelular. Ambos subdominios son diferentes en composición y función (van Meer and Simons 1988). Esta composición se mantiene gracias a la existencia de uniones estrechas y uniones adherentes que evitan la difusión de proteínas y lípidos de la membrana apical a la basolateral y viceversa (Rodríguez-Boulán and Nelson 1989; Balda and Matter 1998).

Las **uniones estrechas o contactos ocluyentes** (*tight junction* o *zona occludens*) constan de al menos tres proteínas transmembrana, las claudinas, la ocludina y las JAM (*Junctional Adhesion Molecules*) (Figura. 6).

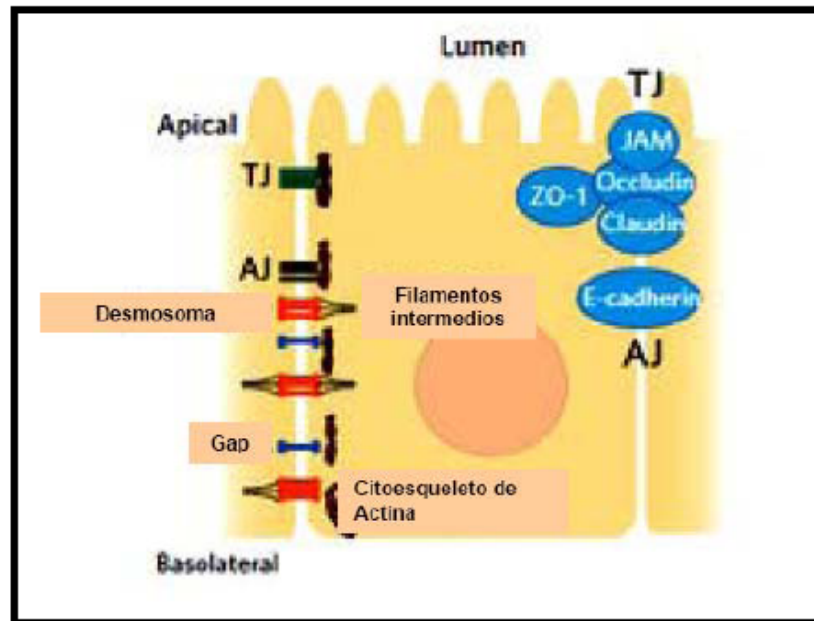


Figura 6. Esquema de los complejos de unión.

La ocludina es una proteína integral de membrana de 60kDa con cuatro segmentos transmembrana. Tanto el extremo carboxiterminal como el aminoterminal están localizados intracelularmente. Existen proteínas encargadas de fijar los complejos proteicos situados en la membrana al citoesqueleto de la célula. Entre estas proteínas podemos citar ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (*Zonula Occludens-1 protein*) y que pertenecen a la familia MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase*) [(Denker and Nigam 1998; Fanning et al. 1998; Niessen 2007; Bauer et al.) 2010]. Los miembros de la familia ZO presentan dominios encargados del acoplamiento de las proteínas transmembrana al citoesqueleto de actina de la célula, de tal forma que las ZO-1 se unen directamente a las claudinas y a los filamentos de actina desempeñando de esta manera funciones estructurales y dinámicas. [(Furuse) 2010].

Ha habido diferentes estudios en los que se ha discutido la importancia de las uniones estrechas en el proceso de migración de las células, destacando la que afirma que la migración celular alteraría la estructura de las uniones estrechas, de forma que las uniones estrechas se deberían de abrir y cerrar durante el proceso de migración (Stein, 1997). Por el contrario, otros estudios afirman que las proteínas de unión estrecha ZO-1, ZO-2 y ocludina permanecen asociadas en los extremos de la célula y su estructura no se ve afectada durante la adhesión y migración de algunos tipos celulares (Burns et al. 2000).

En cuanto a las proteínas de **uniones adherentes**, la más importante es la E-cadherina. El dominio citoplasmático de las cadherinas interacciona con el citoesqueleto de actina indirectamente, a través de su unión con  $\beta$ -catenina o  $\gamma$ -catenina (plakoglobina) y  $\alpha$ -catenina

(Yokoyama et al. 2001). La E-cadherina es esencial en determinados procesos morfogénéticos que tienen lugar en el desarrollo embrionario (Thiery and Sleeman 2006). El nivel de expresión de E-cadherina parece ser el paso limitante en la formación de los complejos de adhesión y su expresión se considera la base del fenotipo epitelial. Existen en la célula epitelial otras uniones intercelulares, como son las **uniones desmosomales o desmosomas** formadas por e-cadherina y moléculas relacionadas, desmogleina y desmocolina que se unen a actina y filamentos intermedios, respectivamente. Las **uniones tipo gap** se caracterizan por la presencia de poros formados por el ensamblaje de moléculas de conexina.

## 4. MIGRACIÓN CELULAR

Para alcanzar su sitio de acción, las células en animales multicelulares no solo se mueven a través de la matriz extracelular sino también por encima de otras o entre otras (Carman 2009). La migración celular ha sido estudiada en muchos estados del desarrollo animal *in vivo*, así como en numerosos tipos de células en cultivo *in vitro*. Aunque muchas de las características generales de la migración se pueden observar en la mayoría de los tipos celulares, los detalles pueden ser muy diferentes dependiendo del tipo celular, del ambiente y del proceso celular en el que tiene lugar la migración. Una célula en migración se polariza, proceso que implica rutas reguladoras muy complejas que integran de manera espacial y temporal todos los componentes necesarios para el movimiento celular. Conceptualmente podemos hablar del **ciclo de la migración** (Ridley et al., 2003) para describir todo el proceso de la siguiente manera: A) inicio de la polarización, B) formación de protrusiones y C) retracción (Figura. 7).

### 4.1 Ciclo de la migración

#### 4.1.1 Inicio de la migración: polarización

La GTPasa Cdc42 junto con el complejo PAR (*partitioning –defective-1*) y PKC (*Protein Kinase C*) están implicadas en las fases iniciales de la generación de polaridad (Rodríguez-Pena et al. 2002; Etienne-Manneville 2004). Como resultado de la activación de este complejo se produce el tráfico dirigido de vesículas hacia el frente de avance así como la organización de microtúbulos, la localización del MTOC (*microtubule organizing center*) en algunas células y del aparato de Golgi delante del núcleo.

En respuesta a un estímulo quimiotáctico, factores de crecimiento o a la señalización por proteínas de la matriz extracelular, se produce la acumulación de PIP3 (*phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate*) localizada en el frente de avance. Esta acumulación localizada de PIP3

es debida a la acción de la PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) que reside en esta zona y de PTEN, una fosfatasa de PIP3 que se localiza en la membrana plasmática de los márgenes y de la zona trasera de las células (Wang et al. 2002; Janetopoulos et al. 2004). PTEN y miosina II están implicadas en restringir la emisión de protrusiones de membrana de manera que éstas sólo se produzcan hacia el frente de avance.

#### 4.1.2 Formación de protrusiones

A fin de avanzar, la célula debe extender su membrana plasmática de atrás hacia delante (frente de avance) de la célula. Las células extienden cuatro tipos diferentes de protrusiones de la membrana plasmática hacia el frente de avance: **lamelipodia**, **filopodia**, **protuberancias irregulares (blebs)** e **invadopodia**. Cada una de estas estructuras contribuye a la migración dependiendo de las circunstancias específicas.

De esta manera tenemos las **lamelipodia** que pueden extenderse a largas distancias a través de la matriz extracelular *in vivo*, tirando las células a través de los tejidos (Friedl and Gilmour 2009). Las **filopodia** que exploran el ambiente celular y son particularmente importantes para guiar el crecimiento de la neurona y para la angiogénesis de los vasos sanguíneos [ (Gupton and Gertler 2007; Eilken and Adams) 2010]. Las **protuberancias irregulares** han sido relacionadas con el establecimiento de la dirección de la migración celular durante el desarrollo (Charras and Paluch 2008), y recientemente se han descrito en células tumorales, células de Dictyostelium *in vitro* y varios tipos celulares *in vivo* (Charras and Paluch 2008; Fackler and Grosse 2008) . Las **invadopodia** son protrusiones que permiten la degradación de la matriz extracelular (Chen 1989), probablemente por facilitar la invasión a través del tejido por medio de MMP-1 (Metaloproteinasa de membrana tipo I) [(Buccione et al. 2009; Schoumacher et al.) 2010]. Estos diferentes tipos de protrusiones pueden coexistir en el frente de avance; así por ejemplo han sido observados en la migración de las células en *zebrafish* durante la gastrulación [(Diz-Munoz et al.) 2010 ]. Muchas moléculas y vías de señalización coordinan la migración celular, pero el citoesqueleto de actina y su dinámica participan en todas la protrusiones mencionadas.

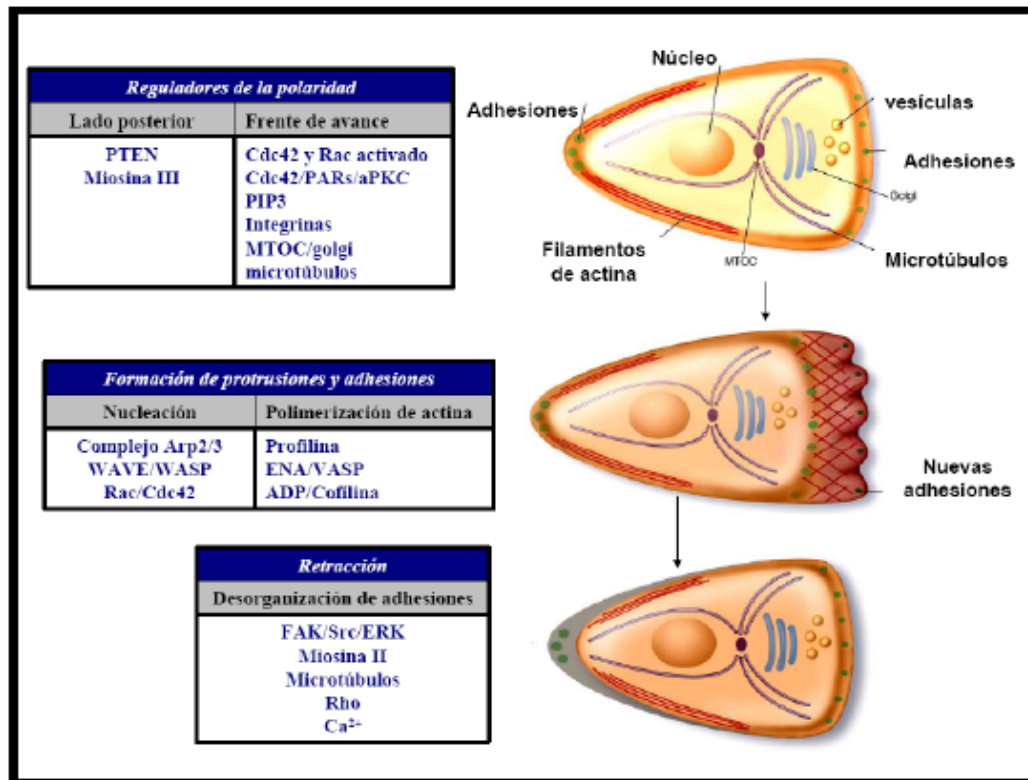


Figura 7. Esquema del ciclo de la migración. A. Polarización celular B. Formación de protrusiones y adhesiones C. Retracción

#### 4.1.3 Retracción

Este proceso está mediado por proteínas que participan en diversas rutas de señalización y que incluyen Src/FAK/ERK/Rho/miosinaII/calcio/calcineurina y calpaina, que en conjunto regulan el desensamblaje de las adhesiones en la zona lateral y trasera de la célula opuesta al frente de avance [(revisado por ((Godde et al.) 2010,(Ridley)2011)].

#### 4. 2 Migracion colectiva

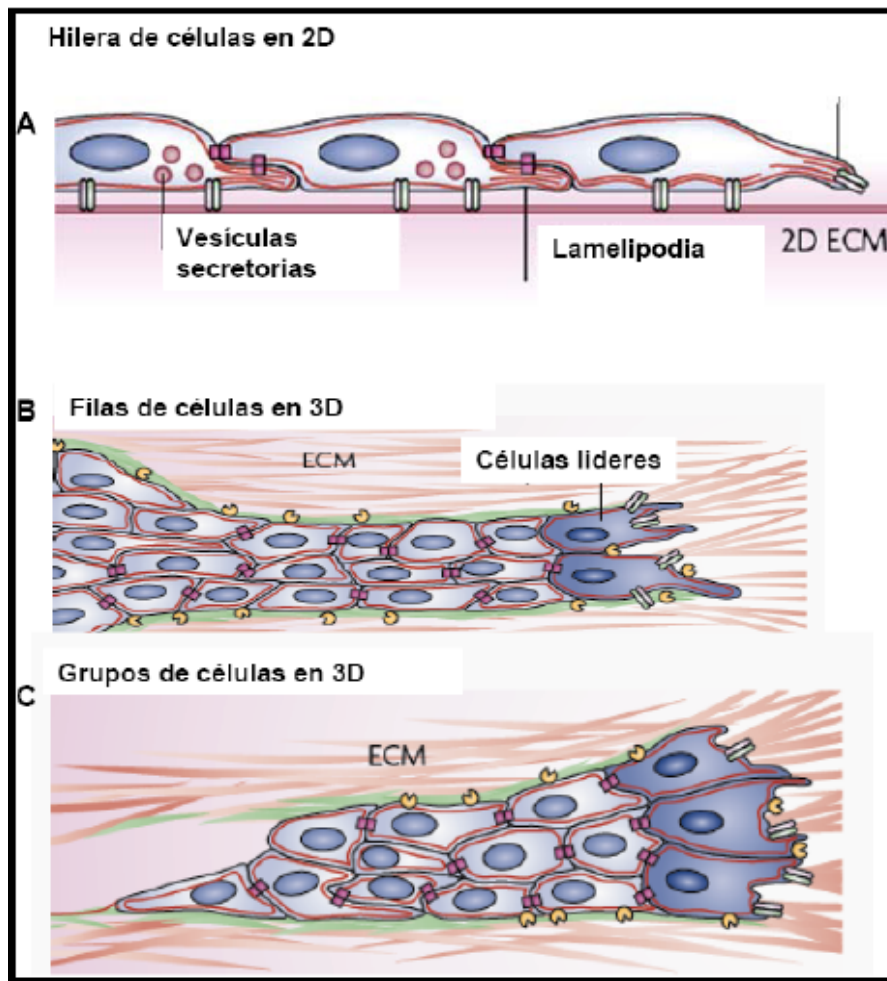
Durante mucho tiempo se ha estudiado *in vitro* la motilidad celular a través de la **migración de células individuales**. Se sabe que este hecho participa en muchos procesos fisiológicos *in vivo*, como el desarrollo, respuesta inmune y cáncer metastático ya que permite que las células se sitúen en los tejidos o tumores secundarios o pasar de forma transitoria a través del tejido, como las células del sistema inmune (Vaughan and Trinkaus 1966; Ridley et al. 2003). No obstante, **la migración colectiva** es el segundo modo principal de movimiento celular (Friedl et al. 2004). Este modo difiere de la migración de células individuales en que las células permanecen unidas mientras se mueven, es una migración en grupo, y parece ser particularmente prevalente durante la embriogénesis impulsando la formación de muchos tejidos y órganos (Montell 2008).

Hay tres aspectos que caracterizan las migración colectiva: primero las células permanecen física y funcionalmente conectadas, de manera que la unión entre célula y célula se conserva durante el movimiento (Friedl et al. 2004; Carmona-Fontaine et al. 2008) Segundo existe una polaridad multicelular y organización supracelular del citoesqueleto de actina que genera la tracción y la fuerza de protrusión para la migración y mantenimiento de la unión célula-célula. Tercero, en la mayoría de modos de migración colectiva el movimiento del grupo de células modifica estructuralmente al tejido a lo largo de la migración causando modificación de la ECM (*extracellular matrix*), incluyendo deposición de la membrana basal. Dependiendo del contexto el movimiento colectivo puede ocurrir en migración en capas en dos dimensiones a través del tejido o filas de células o grupos de células moviéndose a través de estructuras de tejidos tridimensionales [(Revisado por (Friedl and Gilmour 2009))] (Figura.8).

Independientemente de los diferentes modos de migración colectiva, el principio molecular y celular de todos requiere cohesión celular, polarización colectiva, coordinación de la actividad del citoesqueleto, orientación por señales químicas y físicas y cambio en la posición colectiva con respecto al sustrato. Este comportamiento de grupo requiere una organización especial del citoesqueleto supracelular, es decir, la dinámica del citoesqueleto se comparte entre múltiples células para funcionar como una sola unidad generando en forma conjunta la fuerza, migración y remodelación de la ECM. Adicionalmente, el movimiento colectivo supone una interacción íntima con el estroma celular que a su vez está directamente implicado en la inducción de la polaridad y en la liberación de factores pro-migratorios.

En la migración colectiva la adhesión célula-célula es mediada por proteínas de uniones adherentes tales como las cadherinas, miembros de la familia de las inmunoglobulinas e integrinas. Todas están directa o indirectamente conectadas a la actina o a los filamentos intermedios del citoesqueleto, por tanto proporcionan un acoplamiento mecánico y dinámico. La unión cadherina-cadherina entre las células puede ser rápidamente remodelada y esto permite a la célula cambiar su posición en el grupo (Niessen 2007; Kametani and Takeichi 2007)). Las uniones de cadherinas son importantes en la morfogénesis de los túbulos ramificados de los ductos mamarios, traquea, regeneración de la epidermis y en diferentes tipos de cánceres invasivos (Ewald et al. 2008). En ambos modelos de morfogénesis y cáncer, la pérdida de E-cadherina conlleva el debilitamiento de las uniones celulares, seguido de desprendimiento celular y comienzo de un modo de migración de una sola célula, llamado transición epitelio-mesénquima. Estos datos sugieren que la E-cadherina es un importante mediador en las interacciones célula-célula implicadas en la migración colectiva. (Grunert et al. 2003; Thompson and Williams 2008).





**Figura 8. Tipos de migración colectiva. A. Movimiento en cohorte de una monocapa a través de la matriz extracelular en 2D. B. Invasión multicelular en 3D. C Invasión colectiva a través de ECM.**

Existen varios mecanismos por los cuales el grupo de células se polarizan en “células líderes” que guían la migración y en las células posteriores del grupo (Vitorino and Meyer 2008). Esta asimetría del grupo celular es una característica de migración colectiva, donde las células líderes presentan diferentes características morfológicas y son capaces de detectar señales extracelulares y generar una mayor dinámica del citoesqueleto que el resto de las células del grupo. En las hileras multicelulares como en los vasos y ductos ramificados, la polaridad colectiva además resulta del confinamiento lateral de la célula por modificación secundaria de la ECM, incluyendo la degradación de quimoquinas y componentes de matriz extracelular y deposición de los componentes de la membrana basal (Schmidt et al. 2007).

Por otra parte, los principios moleculares del movimiento polarizado de actina y la fuerza generada son similares a los de la migración de células individuales pero son compartidos y coordinados entre las células del grupo. El mecanismo por el cual se organiza supracelularmente el citoesqueleto en las células del grupo es poco conocido (Farooqui and Fenteany 2005). La fuerza generada por las células delanteras, es suficiente para unir y

coordinar la migración de cinco a diez células posteriores de detrás del borde. En algunos, pero no en todos los modelos de capas 2D, parece que tanto las células delanteras como las siguientes muestran lamelipodia polarizadas en la región basolateral de las capas de células en movimiento, con lo cual se ayuda a mantener la translocación coordinada [(Mayor and Carmona-Fontaine)2010)].


Finalmente, se ha descrito una pequeña degradación inicial de colágeno fibrilar intersticial generada por las células delanteras mediante la proteasa MTMMP-1 (conocida también como MMP14). La degradación de la matriz extracelular se amplifica por las células posteriores. Además, de la degradación de la matriz extracelular por el colectivo de células, se depositan componentes de la membrana basal incluyendo lamininas, nidogen-1, perlecan y colágeno tipo IV que le sirven como andamio y orientación al grupo de células en la ECM (Friedl and Wolf 2008).

## 5. TRANSICIÓN EPITELIO- MESÉNQUIMA

Las células epiteliales y mesenquimales difieren en varias características funcionales y fenotípicas. Las **células epiteliales** forman capas de células contiguas mediante estructuras de membranas especializadas como las uniones estrechas, las uniones adherentes, los desmosomas y las uniones *gap* mencionadas anteriormente. Poseen polarización apicobasal, que se manifiesta mediante la distribución localizada de moléculas de adhesión (cadherinas y ciertas integrinas), la organización polarizada del citoesqueleto y la presencia de una membrana basal. Las células epiteliales en condiciones normales no se aíslan ni migran, aunque tienen cierta capacidad motriz dentro de la capa epitelial (Thiery and Sleeman 2006) en cultivo y crecen en *clusters* manteniendo las adhesiones con las células vecinas. Algunos marcadores epiteliales son E-cadherina, desmoplaquina y citoqueratina. En contraste, las **células mesenquimales** no forman capas organizadas, no poseen la misma polaridad apicobasolateral, ni la misma organización del citoesqueleto que las células epiteliales. Las adhesiones con las células mesenquimales vecinas son menos fuertes y no están asociadas a una lámina basal, lo que les permite una mayor capacidad migratoria. En cultivo, las células mesenquimales tienen forma de huso, con una morfología similar a los fibroblastos y tienden a ser motrices. Presentan expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, filamentos intermedios (vimentina) y componentes de la matriz extracelular como fibronectina (LaGamba et al. 2005) .

Por tanto, los tejidos mesenquimales son menos organizados y en muchos casos juegan un papel de soporte o de relleno, mientras que los tejidos epiteliales presentan una organización más compacta responsable de recubrir las diferentes cavidades del organismo y comportarse como una barrera que, entre otras funciones, protege, absorbe y secreta sustancias. Aunque el

mantenimiento de la morfología epitelial es necesario para realizar las diferentes funciones celulares, numerosas observaciones demostraron cómo células epiteliales diferenciadas podrían cambiar su fenotipo a través de la activación del programa EMT (*epithelial to mesenchymal transition*). Por lo tanto, la EMT permite la conversión de células epiteliales en mesenquimales ([revisado por (Kalluri and Weinberg 2009)]. Las consecuencias de la EMT se dan a varios niveles: cambios morfológicos, cambios en los marcadores de diferenciación y cambios en la movilidad celular (Figura. 9).

**EPITELIAL**  **MESÉNQUIMAL**

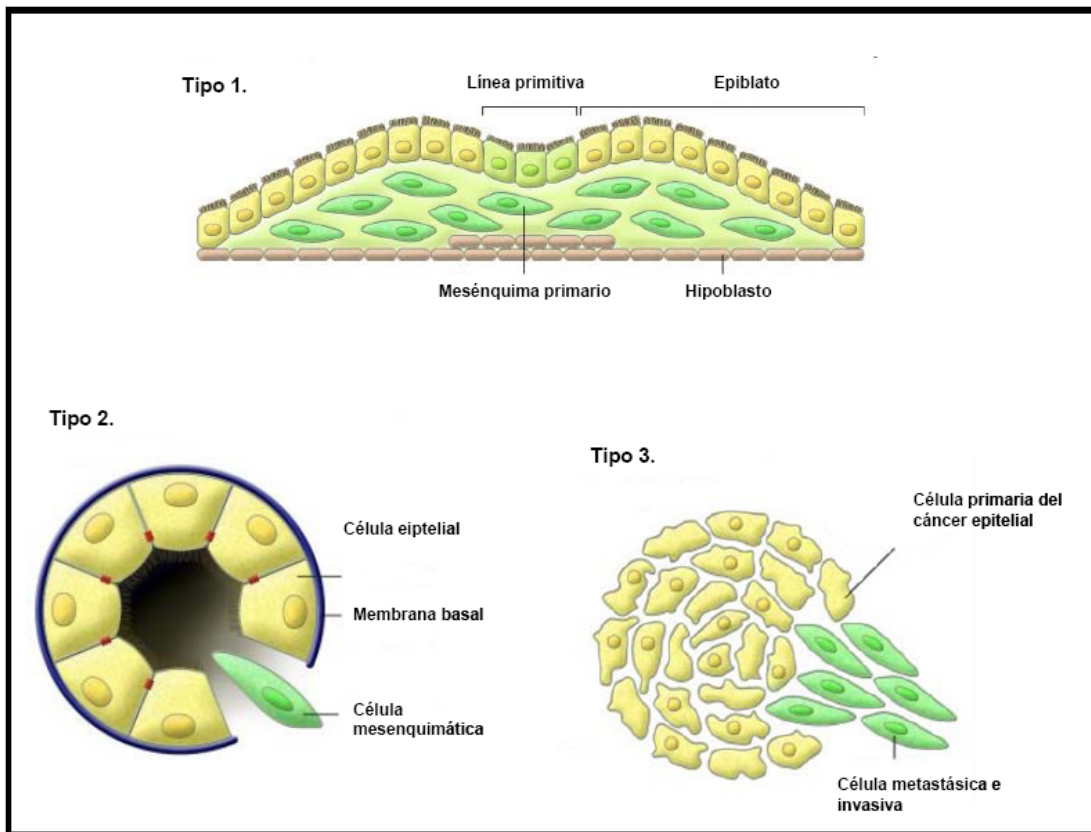
Polarizado	no polarizado
Fuerte unión célula- célula basada en E-cadherina	Leve interacción célula-célula basada en E- cadherina y N cadherina
Baja interacción célula- matriz	Alta interacción célula- matriz
Baja capacidad migratoria	Alta capacidad migratoria

**Figura 9. Tabla sobre las características generales de la EMT**

Se define como EMT al proceso biológico que permite que las células cambien de un fenotipo polarizado y epitelial a uno altamente motriz y fibroblastoide. Durante la EMT se producen alteraciones en la adhesión célula- célula, en las interacciones célula-sustrato, en la degradación de la matriz extracelular y en la reorganización del citoesqueleto (Huber et al. 2005). La completa EMT se alcanza cuando tiene lugar la degradación de la membrana basal y se forma una célula mesenquimal que puede migrar. Por lo tanto, la EMT engloba un amplio espectro de cambios macromoleculares, intercelulares e intracelulares. No siempre se pueden observar todos ellos durante una transición, por lo que en muchas ocasiones no se habla de una EMT completa sino de una *EMT-like* o EMT parcial (Yang and Weinberg 2008).

## 5.1 Clases de EMT

La EMT se puede clasificar en tres subtipos diferentes dependiendo del contexto celular donde tiene lugar y del fenotipo de la célula resultante. Entre los tres subtipos existen diferencias funcionales que generan distintas consecuencias (Figura. 10).



**Figura 10. Clases de EMT. Tipo 1. Durante el desarrollo embrionario. Tipo 2. Asociada con la regeneración tisular y la fibrosis. Tipo 3. Asociada con la progresión tumoral y metástasis**

## 5.2 EMT Clase 1: EMT durante el desarrollo embrionario

Este tipo de EMT tiene lugar durante la implantación del embrión en el útero, durante la gastrulación y durante la formación de la cresta neural en amniotas (Pijnenborg et al. 1980). En el embrión la primera EMT ocurre durante la gastrulación y conlleva la formación de la tercera capa embrionaria, el mesodermo: las células del ectodermo cambian de fenotipo y se invaginan formando el surco ventral y migran hacia el interior del epiblasto. [Hay, 1995]. También se observa un proceso de EMT en la migración de las células de la cresta neural: las células del borde del tubo neural deben delaminarse y migrar hacia sitios lejanos, donde se diferencian a células tan dispares como melanocitos, células de músculo liso o neuronas, contribuyendo a la generación de numerosos tejidos especializados (Yang y Weinberg, 2008; Sauka-Spengler y Bronner-Fraser, 2008 (Acloque et al. 2009; Kalluri 2009).

## 5.3 EMT Clase 2: EMT asociada a la regeneración tisular y la fibrosis

Este tipo de EMT, a diferencia de la clase 1, tiene lugar en el tejido adulto. En respuesta a señales inflamatorias o daño tisular, las células epiteliales experimentan una EMT generándose fibroblastos que intervienen en el proceso fibrótico que tiene lugar en los órganos

dañados (Kalluri and Neilson 2003). Estos fibroblastos liberan una gran variedad de señales inflamatorias, como el TGF- $\beta$  (Flanders 2004) y componentes de ECM como colágenos y lamininas y elastina.

El proceso de EMT tipo 2 está estrechamente relacionada con procesos fibróticos en diferentes órganos como riñón, hígado, pulmón e intestino. En concreto se calcula que el 36% de los fibroblastos implicados en la fibrosis renal provienen de células locales que han sufrido una EMT (Iwano et al. 2002; Kalluri and Neilson 2003; Neilson 2005; Willis et al. 2005).

Durante el proceso de curación de heridas (*wound healing*) algunas células alrededor de la herida, gracias a la EMT, restauran la arquitectura original del tejido (Martin 1997). Por ejemplo, después del daño en la piel, los queratinocitos epidérmicos situados a lo largo de los límites de la herida sufren un proceso similar a la EMT antes de migrar al lugar del daño (Martin 1997; Schafer and Werner 2008). Estos queratinocitos en el borde de la herida pierden sus contactos célula-célula y célula-sustrato, e inician la secreción de enzimas que degradan la matriz y reorganizan el citoesqueleto, lo que les permite invadir el tejido conectivo subyacente y migrar hasta la herida, participando en la re-epitelización del tejido. La mayoría de los mecanismos que gobiernan la curación de heridas guardan analogías con el proceso de invasión tumoral que ocurre durante la primera fase de la metástasis, por ello ciertos autores han denominado a los tumores como “heridas que no curan” (Schafer and Werner 2008).

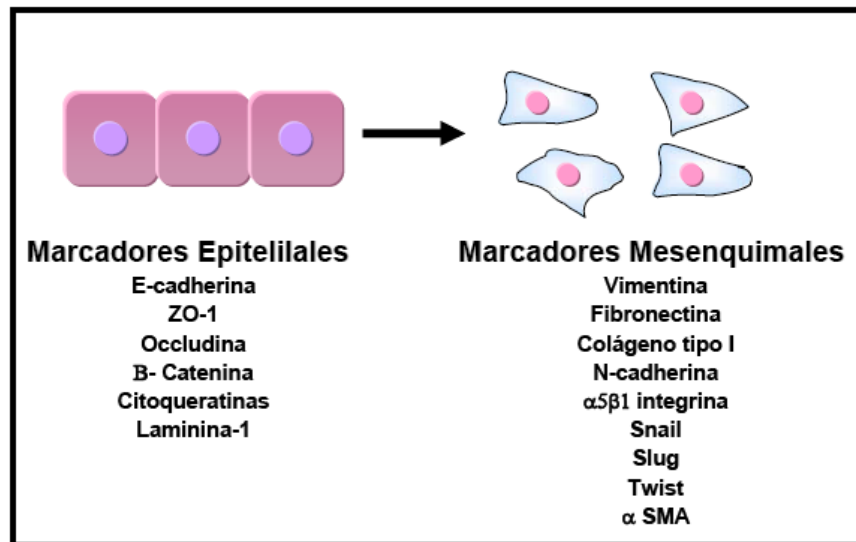
### **5.4 EMT Clase 3: EMT asociada con la progresión tumoral y metástasis**

La excesiva proliferación de células epiteliales y la angiogénesis son marcadores de la iniciación y crecimiento de un carcinoma primario (Hanahan and Weinberg 2000). La adquisición de la capacidad invasiva se manifiesta inicialmente por la degradación de la membrana basal. La EMT se ha propuesto como mecanismo crítico para la adquisición del fenotipo maligno por células epiteliales cancerosas (Thiery 2002). Estas células que sufren EMT se encuentran en el frente invasivo de tumores primarios, expresan marcadores mesenquimales y son capaces de ser transportadas por la circulación y formar micrometastasis (Gavert and Ben-Ze'ev 2008).

### **5.5 Regulación transcripcional de la EMT**

Un número elevado de procesos moleculares cooperan en la iniciación y en la finalización de la EMT. Entre ellos se encuentran: 1. La activación de factores de transcripción. 2. La expresión de proteínas de superficie. 3. La reorganización y expresión de proteínas del citoesqueleto. 4. La producción de enzimas que degradan la ECM y 5. Cambios en la expresión

de miARNs. En la figura 11 se muestran la mayoría de los marcadores responsables de estos cambios durante la EMT (De Wever et al. 2008). Un paso clave en la EMT es la reducción de la adhesión célula-célula mediante la represión transcripcional de las cadherinas componentes de las uniones adherentes, de ocludina y claudina componentes de las uniones estrechas y de desmoquin componente de los desmosomas (De Wever et al. 2008).



**Figura 11. Marcadores epiteliales y mesenquimales en EMT.**

Los filamentos de actina del citoesqueleto son reemplazados por una red de fibras de estrés regulada por Rho-GTPasa, donde se unen componentes de la ECM incluyendo integrinas  $\alpha v \beta 6$  fascina (Fuchs et al. 2008). Estos cambios son suficientes para que las células puedan separarse, pierdan la polaridad apico-basal y adquieran un fenotipo en forma de huso: dichos cambios facilitan la migración celular (Hugo et al. 2007). La expresión de los filamentos intermedios también cambia durante la EMT con la sustitución de las citoqueratinas de células epiteliales por la vimentina, típica de células mesenquimales (Omary et al. 2004). Las metaloproteasas 1, 3, 7, y 14 aumentan frecuentemente durante la EMT participando, seguramente, en la pérdida de las uniones célula-célula y en la degradación de la membrana basal.

Una marca característica de la EMT es la pérdida de la E-cadherina (Onder et al. 2008). La E-cadherina es el principal componente de las uniones adherentes. Se expresa, entre otras circunstancias, en el desarrollo embrionario, donde su función es esencial para la inducción y el mantenimiento de la polaridad celular (Uemura et al. 1996) y se mantiene su expresión en células epiteliales del organismo adulto. La alteración de la expresión de E-cadherina es suficiente para desencadenar EMT (Burdal et al. 1993; Onder et al. 2008).

El factor de transcripción Snail1 es un potente inductor del proceso de EMT, dando lugar a células mesenquimales con propiedades migratorias que contribuyen a la formación de varios tejidos durante el desarrollo embrionario y en la adquisición de propiedades invasivas en tumores epiteliales (Cheng et al. 2007). Snail1 reprime la expresión de E-cadherina e induce una completa EMT en múltiples modelos celulares como células MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) y en líneas celulares de cáncer de mama (Cano et al. 2000; Bolos et al. 2003). (Blanco et al. 2002; Barrallo-Gimeno and Nieto 2005). SNAIL fue el primer factor de transcripción identificado capaz de reprimir la expresión de E-cadherina. Posteriormente se han identificado otros factores de transcripción adicionales capaces de reprimir la transcripción de E-cadherina, tales como Slug (Snail2), miembros de la familia bHLH como Twist y E47/TCF3 TCF4/E2- y los factores homeobox con dos dedos de zinc Zeb1 y Zeb2 [Hajra 2002,] [Comijn et al., 2001; Eger et al., 2005]. [Perez-Moreno et al., 2001].

## 6. FACTOR DE CRECIMIENTO HEPÁTICO (HGF) Y SU RECEPTOR MET.

### 6.1 Expresión, síntesis y estructura del HGF.

El HGF fue originalmente identificado como un mitógeno para hepatocitos (Nakamura et al. 1989) a principios de los años 80. A partir de suero de ratas hepatectomizadas se purificó un factor que inducía de forma muy acusada la proliferación de los hepatocitos *in vitro*. Se denominó a este factor HGF (de *Hepatocyte Growth Factor*), [Nakamura et al. 1984; Russell et al. 1984]. También es conocido como SF (de *Scatter Factor*), ya que se descubrió, de forma independiente, como un producto de la secreción de fibroblastos y células de músculo liso que promovía la motilidad de las células epiteliales (Stoker et al. 1987). Posteriormente se demostró que ambas moléculas eran idénticas (Naldini et al. 1991b; Weidner et al. 1991).

El HGF es el prototipo de una familia de factores de crecimiento conocidos como PRGFs (factores de crecimiento relacionados con el plasminógeno), debido a que todos ellos son proteínas de gran tamaño (aproximadamente 100kDa) que tienen un dominio estructural similar al del plasminógeno (Gherardi et al. 1997). El HGF se sintetiza como un precursor de 728 aminoácidos de cadena única (pro-HGF) y como tal está presente en la superficie celular y matriz extracelular. Este pro-HGF es convertido a la forma activa por ruptura proteolítica entre Arg494 y Val495 a través de diversas serín proteasas específicas del suero o de la membrana celular, tales como el uPA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa), el tPA (activador de plasminógeno tisular), matriptasa, hepsina, kallikreina del plasma [(Kataoka and Kawaguchi) 2010)], los factores de coagulación sanguíneo XIIa y XI, y el HGF-A (activador de HGF), este último es un miembro de la superfamilia de las serín proteasas que contienen dominios Kringle

(estructuras de doble lazo, de 80 aminoácidos, estabilizados por puentes disulfuro intramoleculares). El HGF-A es producido en forma de zimógeno inactivo por las células epiteliales hepáticas en respuesta a daño tisular y posteriormente activado por trombina, la activación de esta última ocurre durante la cascada de coagulación y, por tanto, participa en la activación de HGF en respuesta a lesión tisular.(Figura. 12)[(Naldini et al. 1992; Mars et al. 1993; Miyazawa et al. 1993; Mizuno and Nakamura 1993; Shimomura et al. 1993; Bardelli et al. 1994) (Miyazawa), 2010 )]

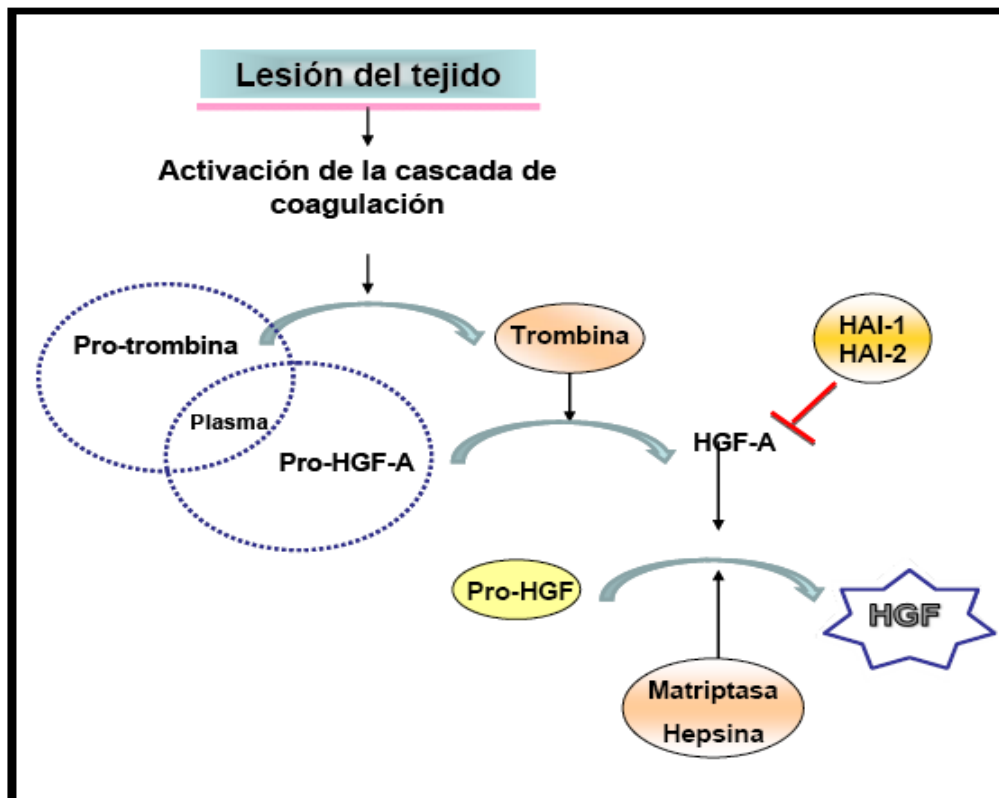


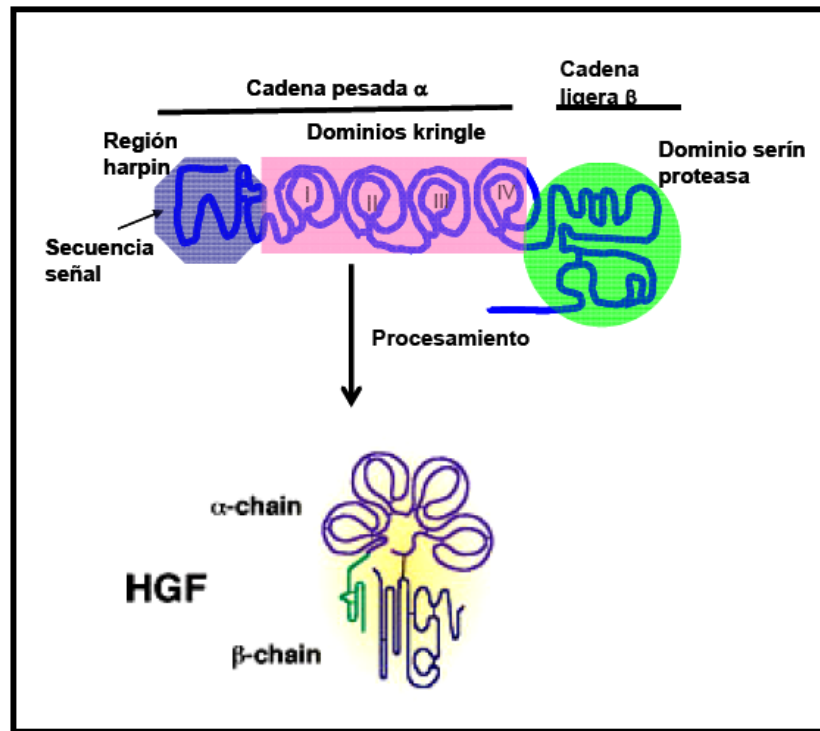
Figura 12. Activación del HGF en respuesta a un tejido lesionado.

## 6.2 Activación del HGF

La forma activa del HGF consiste en una proteína heterodimérica compuesta por una cadena pesada (cadena  $\alpha$ , de 69 kDa), que contiene un péptido señal típico que se rompe durante la secreción, seguido de una estructura de lazo u horquilla en su extremo N-terminal y cuatro dominios tipo bisagra *kringle* y una cadena ligera (cadena  $\beta$  de 34kDa), que contiene un motivo de tipo serín-proteasa, unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura. 13). Ambas cadenas están contenidas en una secuencia nucleotídica única que codifica para la proteína precursora pre-pro-HGF, de 728 aminoácidos. En humanos, el gen de HGF tiene un tamaño total de 70kb y contiene 18 exones y 17 intrones (Nakamura et al. 1989; Nakamura 1991; Seki et al. 1991). La



estructura primaria del HGF humano y de roedores tiene un 90% de homología (Zarnegar et al. 1992).



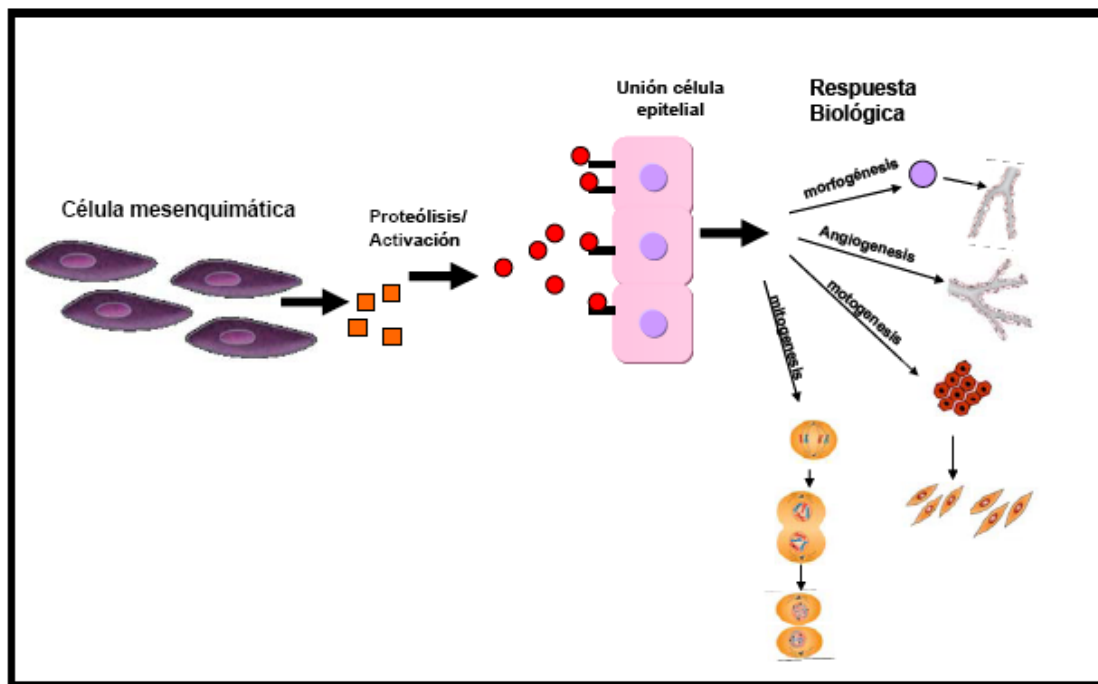
**Figura 13. Procesamiento y estructura del HGF. (Adaptación de Birchmeier and Gherardi,1998).**

El HGF es producido por fibroblastos y otras células mesenquimáticas de distintos órganos, como hígado, pulmón, riñón, placenta y cerebro, tanto durante el desarrollo como en la etapa adulta, pero son las células epiteliales las que expresan el receptor y responden a este factor (Sonnenberg et al. 1993; Yang and Park 1995).

Existen algunas excepciones a esta regla, es decir células que expresan tanto el ligando como el receptor y que presentan, por tanto, un mecanismo de acción autocrino. Tal mecanismo se ha descrito, por ejemplo, durante el desarrollo del sistema nervioso, también en células progenitoras hepáticas, en procesos de carcinogénesis hepática y cerebral (glioblastoma), en osteosarcoma y melanoma (Maina et al. 1998; Horiguchi et al. 2002; Peruzzi and Bottaro 2006; del Castillo et al. 2008). No obstante, el mecanismo de acción paracrino (Figura.14) sigue considerándose un rasgo muy generalizado y distintivo de la señalización disparada por el HGF. La regulación del HGF y su receptor en células productoras y dianas constituye uno de los puntos de regulación de la vía. Entre las moléculas que inducen la producción de HGF se encuentran la noradrenalina, las interleuquinas 1 y 6 (IL-1y IL-6), las prostaglandinas y factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o el factor de crecimiento transformante tipo alpha (TGF- $\alpha$ )

(Matsumoto et al. 1992; Boccaccio et al. 1994; Gohda et al. 1994; Matsumoto et al. 1995; Zarnegar 1995; Blanquaert et al. 1999).

El HGF se une con gran afinidad a heparina y al proteoglicano heparán sulfato, limitando de esta manera su difusión *in vivo* y asegurando al mismo tiempo la acumulación del factor en las proximidades de las células productoras y por tanto un mecanismo de acción local. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con otros factores de crecimiento de unión a heparina, el heparán sulfato no es esencial para la unión a su receptor y para la señalización (Matsumoto et al. 1993; Zioncheck et al. 1995; Hartmann et al. 1998)



**Figura 14. Mecanismo de acción paracrino de la señalización de HGF/Met. (Adaptación de Birchmeier and Gherardi, 1998.**

### 6.3 Expresión, síntesis y estructura de c-Met.

El HGF se une con gran afinidad a un receptor transmembrana de tipo tirosina quinasa, conocido como c-Met o Met. Al igual que muchas otras tirosina quinasa, Met fue originalmente identificado en su forma mutada, como un oncogén, en líneas celulares humanas de osteosarcoma (Cooper et al. 1984; Bottaro et al. 1991). La oncoproteína tiene una alta actividad tirosina quinasa constitutiva y capacidad transformante y es el resultado de una reorganización del DNA en la que secuencias del locus de la región promotora translocada (TPR, de *translocated promoter region*) en el cromosoma 1 se fusionan con secuencias del locus de Met en el cromosoma 7, de ahí el nombre de Tpr-Met (Park et al. 1986). Met pertenece a una familia de tirosina quinasa heterodiméricas, que incluye además los receptores Ron, Ryk y Sea (Huff et al. 1993; Ronsin et al. 1993; Gaudino et al. 1994). Como se mencionaba

anteriormente, Met se expresa mayoritariamente en células epiteliales de prácticamente todos los tejidos, pero también en células endoteliales y neuronas (Sonnenberg et al. 1993). Su expresión es inducida por múltiples factores, entre ellos el propio HGF, EGF, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , los estrógenos, la progesterona, el tamoxifeno y la dexametasona (Boccaccio et al. 1994; Moghul et al. 1994; Zarnegar 1995).

El receptor codificado por el proto-oncogén *c-Met* se localiza sobre todo en las uniones intercelulares junto a moléculas de adhesión celular como la E-cadherina [(revisado por (Birchmeier et al. 2003)]. Esta proteína se sintetiza como una cadena polipeptídica única de 150 kDa, que sufre glicosilación parcial para dar una proteína precursora de aproximadamente 170 kDa (p190met), la cual además de glicosilación sufre una ruptura proteolítica dando lugar a una proteína heterodimérica madura. Esta forma madura de Met está compuesta de una cadena  $\alpha$  de 50kDa y una cadena  $\beta$  de 145 kDa unidas por puentes disulfuro. La región N terminal de la cadena  $\alpha$ , como la cadena  $\beta$ , están localizadas en el exterior de la membrana celular, esta última además contiene una región transmembrana y una región intracelular, que contiene un dominio catalítico proteína quinasa y un dominio de anclaje C-terminal para proteínas adaptadoras que median la traducción de la señal (Figura.15) (Weidner et al. 1991; Comoglio 1993).

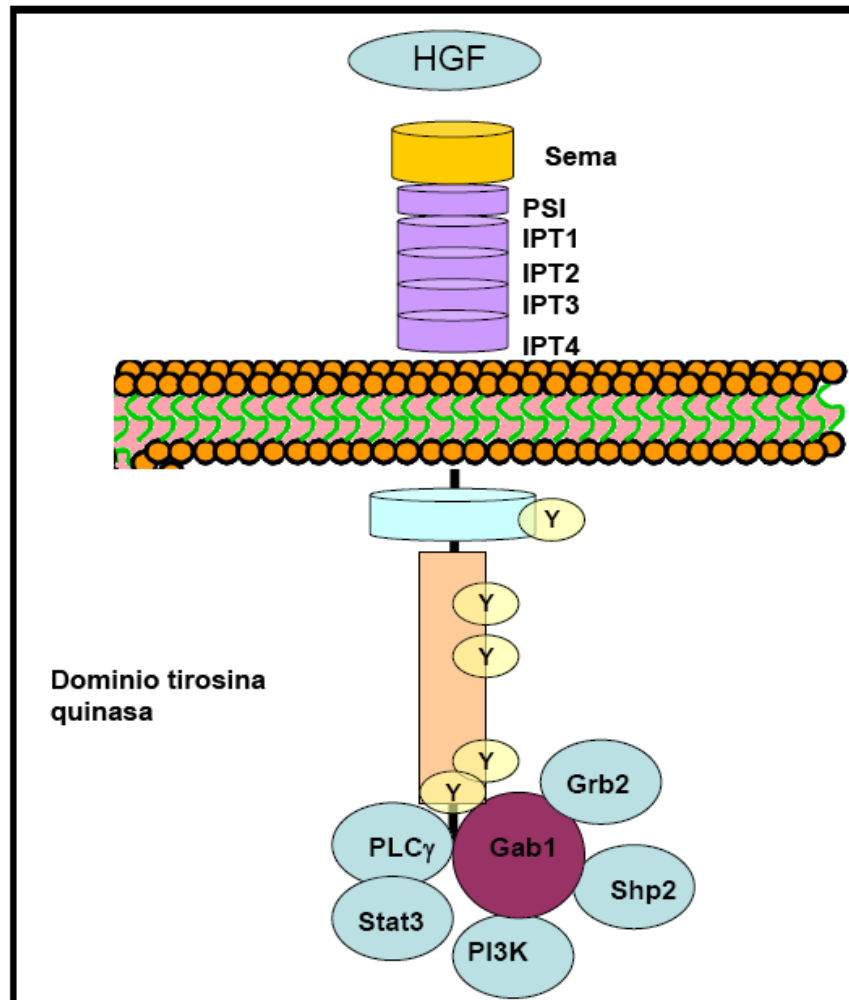


Figura 15. Estructura de Met . (adaptación de Nakamura 2011).

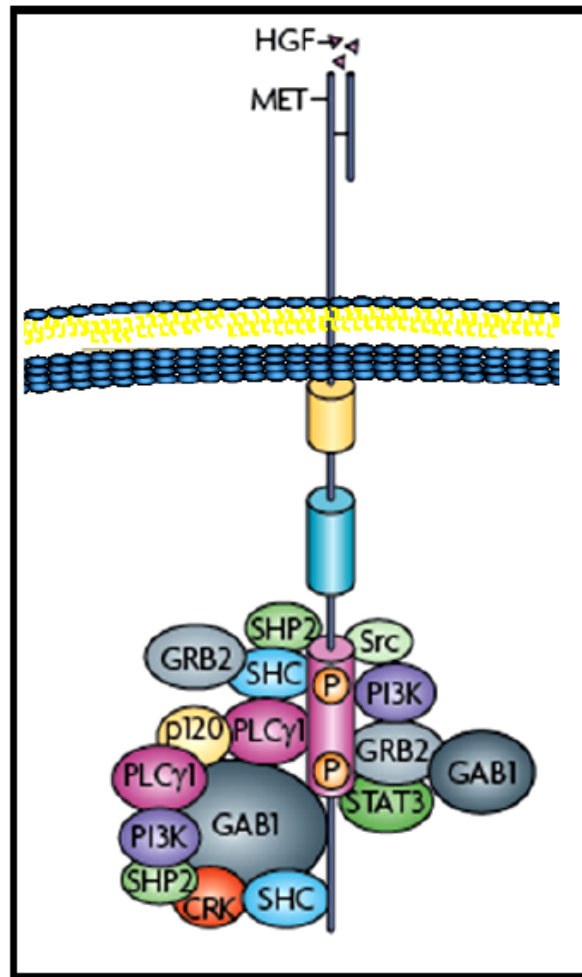
#### 6.4 Activación de Met.

La unión de HGF a su receptor Met es mediada primero por la unión a la cadena  $\alpha$  de alta afinidad a través de NK1 (primer dominio kringle en N terminal), esta unión confiere alta afinidad pero no activa al receptor Met (Matsumoto et al. 1998; Stamos et al. 2004). Sin embargo facilita la unión de la cadena  $\beta$  de baja afinidad y consecuentemente la activación de Met disparando la autofosforilación del dominio citoplasmático de Met. En concreto se fosforilan dos residuos de tirosina en el dominio catalítico, Y1234 y Y1235, evento que es crucial para la inducción de la actividad tirosina quinasa de Met, ya que la eliminación de estas dos tirosinas impide la autofosforilación y por tanto la activación del receptor. Subsecuentemente, se fosforilan las tirosinas Y1349 y Y1356 en el dominio de anclaje C-terminal, lo que es esencial para el reclutamiento y activación de proteínas adaptadoras y transductoras de la señal (Ferracini et al. 1991; Naldini et al. 1991a; Longati et al. 1994). Además de esta regulación positiva por fosforilación, Met también está sujeto a una regulación negativa. Así, la fosforilación de un residuo de serina (Ser 985) localizado en la región

yuxtamembrana, por PKC y proteínas quinasas dependientes de calcio, inhibe la fosforilación en tirosina de la subunidad  $\beta$  del receptor y por tanto la actividad tirosina quinasa de Met (Comoglio 1993; Bardelli et al. 1994).

La subunidad  $\beta$  de Met se asocia a numerosas proteínas adaptadoras y transductoras de señales intracelulares, a través de tres tipos de dominios: SH2 (de *SH2 phosphate containing inositol 5'- Phosphatase*), PTB (*phosphotyrosine binding*) y MBD (*Met binding domain*) presentes en dichas proteínas. A su vez, estas proteínas se unen a otras proteínas adaptadoras y factores de transcripción a través de dominios de homología con Src de tipo 3 (SH3), modulando su actividad.

Entre los componentes del complejo de señalización que son reclutados por Met tras su activación se encuentran las proteínas adaptadoras Grb-2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), Gab-1 (*Grb-2-associated binding protein 1*), SHC (*Src homology 2 domain containing transforming protein*), Crk/CRKL (*v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like*), y otras proteínas transductoras bien conocidas, como PI3K, rasGAP (*ras guanosine triphosphatase activating protein*), PLC- $\gamma$  (*phospholipase C-gamma*), p59<sup>FYN</sup>, pp60<sup>c-src</sup>, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina SOS (*son of sevenless*), las fosfatasas SHP2 (*Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*) y SHP1 (*SH2 inositol 5-phosphatase 1*) y el factor de transcripción STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) [(revisado por (Furge et al. 2000; Stuart et al. 2000)] (Figura. 16).



**Figura 16. Proteínas adaptadoras asociadas a Met.**

Una molécula muy importante en la señalización de Met es la proteína adaptadora Gab1. Esta proteína puede unirse a Met directamente, a través de un sitio de unión a Met (MBD), pero también puede ser reclutada a través de Grb2. Tras activarse, Met fosforila a Gab1 en varios residuos de tirosina necesarios para reclutar proteínas diana que contienen dominios SH2, como PLC- $\gamma$ , SHP2, Crk/CRKL, Gab1 y PI3K (Gu and Neel 2003; Schaeper et al. 2000).

Usando moléculas de Gab1 mutantes, con mutaciones en residuos de tirosina específicos, se ha visto que el complejo Gab1-PLC- $\gamma$  es necesario para la tubulogénesis inducida por HGF, mientras que Gab1-SHP2 es necesario para la activación sostenida de ERK1/2/MAPK y la morfogénesis epitelial. c-Crk y CRKL se unen a Gab1 y reclutan C3G y DOCK180. C3G regula la adhesión celular mediante la activación de Rap1 (*RAs-related Protein*), y DOCK180 activa Rac1 (*RAs-related C3 botulinum toxin*) y media la extensión celular (*spreading*) y migración inducidos por Met.

Asimismo, parece que Met puede interaccionar con proteínas de la membrana plasmática como CD44, la integrina  $\alpha 6 \beta 4$ , ezrina, la plexina B1, el receptor Fas, receptores de

semaforinas o E-cadherina con el fin de ejercer sus diversas funciones [(revisado por (Birchmeier et al. 2003)]Se cree que esta asociación participa en la especificidad de la respuesta biológica (Bertotti and Comoglio 2003).

## 7. SEÑALIZACIÓN Y REGULACION DE LA SEÑALIZACION HGF/Met

### 7.1 Señalización intracelular

Las evidencias disponibles hasta el momento dejan claro que el HGF activa múltiples vías de transducción de señales (Figura. 17) y que moléculas transductoras específicas juegan un papel importante en algunas de las respuestas celulares a este factor. Además, sugieren que la expresión de un conjunto determinado de proteínas adaptadoras y transductoras, en un tipo celular específico, proporciona las bases para la especificidad de la/s respuesta/s al HGF en dichas células. Revisado por (Comoglio 2001; Maina et al. 2001; Rosario and Birchmeier 2003).

La activación de la señal se inicia con la unión del HGF al receptor Met produciendo dimerización del receptor y trans-fosforilación de dos residuos tirosina (Y1234 y Y1235) en el bucle de activación. El siguiente paso es la fosforilación de dos tirosinas adicionales en la cadena C-terminal (Y1349 y Y1356), actuando así, como un “*motif*” para reclutar muchas moléculas traductoras de la señal (Ponzetto et al. 1994) y por tanto la activación de varias vías que incluyen a) la cascada de proteínas MAPKS (*Mitogen Activated Protein Kinases*), ERK1 y ERK2, JNKs (*c-Jun N-terminal Kinases*) y p38 MAPK, b) la vía de PI3K–AKT y activación de NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) y c) la vía de activación de STAT-3. (Sipeki et al. 1999; Maroun et al. 2000; Birchmeier et al. 2003).

Todas estas vías están organizadas para transmitir información bioquímica desde la membrana celular al núcleo (donde ocurre la modulación y la expresión génica) y de esta manera Met participa en el control de procesos como son proliferación, supervivencia y migración.

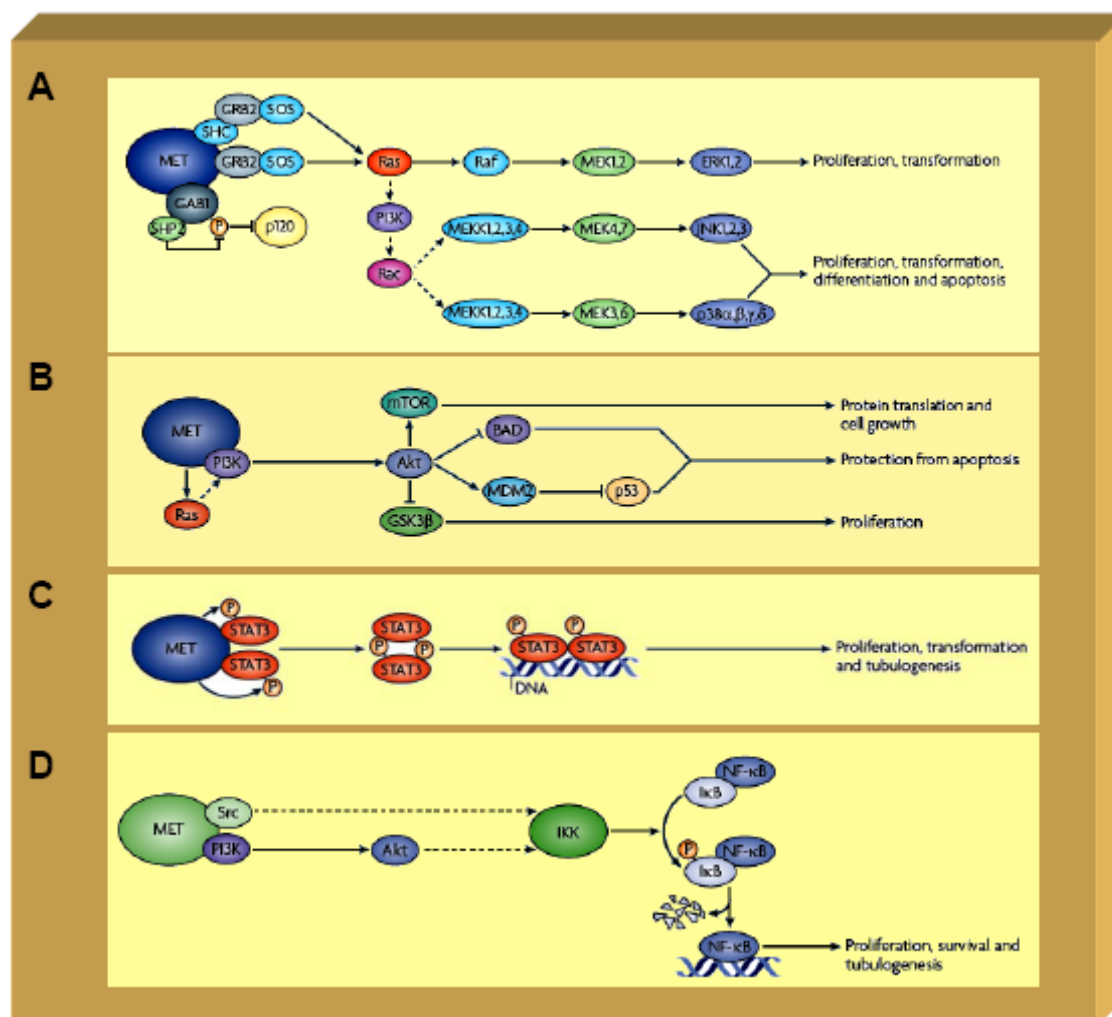




ser asociado indirectamente a través de la proteína adaptadora SHC o SHP2. (Ponzetto et al. 1994; Johnson and Lapadat 2002). SOS convierte en la membrana a Ras-GDP en la forma activa Ras-GTP iniciando la cascada de activación de la quinasa Raf1 (MAPKKK), MEK (MAPKK), y ERK (Chang and Karin 2001). Otra ruta que conlleva a la activación de Ras-ERK está mediada por la tirosina fosfatasa SHP2, la cuál activa la desfosforilación de p120-Ras-GAP uniéndose en GAB1; esto impide que se reclute p120-Ras-GAP que (usualmente desactiva Ras). (Maroun et al. 2000; Montagner et al. 2005) ) (Figura.18).

Una vez activadas las ERKs se traslocan al núcleo, donde fosforilan y estabilizan varios factores de transcripción que participan en las fases tempranas de transición de G1-S del ciclo celular. De esta manera, la respuesta proliferativa requiere la activación de Ras-Raf-ERK1/2/MAPK a través del complejo Grb2-SOS. Esta cascada (Grb2-SOS-Ras-MAPK) también se ha implicado en migración, invasión y morfogénesis (Maina et al. 2001) [(revisado por (Gao and Vande Woude 2005; Trusolino et al.)].

Met también es capaz de activar otras rutas de la familia de las MAPK, JNK y p38 MAPKs. Para ambas familias el primer componente de la cascada, una MAPKKK (MAPKKK1–MAPKKK4; también conocida como MEK kinase 1 (MEKK1–MEKK4) es usualmente estimulado por Rac (una pequeña GTPasa). Así la fosforilación de MEK4 y MEK7 conlleva la activación de JNK1, JNK2 y JNK3, mientras que la fosforilación de MEK3 y MEK6 conlleva la activación de p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Una vez activadas las JNKs y p38s son capaces de controlar procesos celulares tan diversos como proliferación celular, diferenciación, transformación y apoptosis (Johnson and Lapadat 2002; Coltell et al. 2006).



**Figura 18. Señalización regulada por Met. A. Vía MAPK B. Vía PI3K C. Vía STAT-3 D. Vía IKK (Nuclear Factor- $\kappa$ B Inhibitor- $\alpha$  Kinase).**

### 7.3 La vía PI3K-AKT

La activación de PI3K resulta en formación de fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato que tiene capacidad de unirse a moléculas que contienen dominios con homología pleckstrina (PH), como por ejemplo la Ser/Thr-quinasa Akt. AKT (*AK strain Transforming; v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) ha sido relacionada con la supresión de la apoptosis a través de inactivación de Bad (proteína pro-apoptótica de la familia de proteínas Bcl2) y activación de la proteína ubiquitina ligasa Mdm2 la cual promueve la degradación de la proteína pro-apoptótica p53.

Además, AKT inactiva la glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), que antagoniza la expresión de reguladores positivos del ciclo celular, (Myc y Ciclina D1) y activa en mamíferos el complejo 2 de rapamicina (mTORC2), estimulando las síntesis de proteínas y ampliando el

ciclo celular (Figura.18). La vía de PI3K puede ser activada directamente por Met o indirectamente por Ras, este último también puede ser activado por Met (Ponzetto et al. 1994).

La vía PI3K-AKT está estrechamente relacionada con el programa de “crecimiento invasivo” es decir, con la inducción EMT, aumento proliferación celular y supervivencia.(Benvenuti and Comoglio 2007). Específicamente PI3K-AKT participa en proliferación, motilidad celular y angiogénesis (Birchmeier et al. 2003; Vivanco and Sawyers 2002). Además se requiere para la dispersión celular (*scatter*), la morfogénesis y la supervivencia (revisado por (Birchmeier and Gherardi 1998; Gao and Vande Woude 2005).

Tanto la vía de PI3K como la vía MAPK promueven un número de respuestas tumorogénicas a través de efectos en la expresión génica, dinámica del citoesqueleto, regulación del ciclo celular y metabolismo (Dhillon et al. 2007).

### 7.4 La vía STAT-3

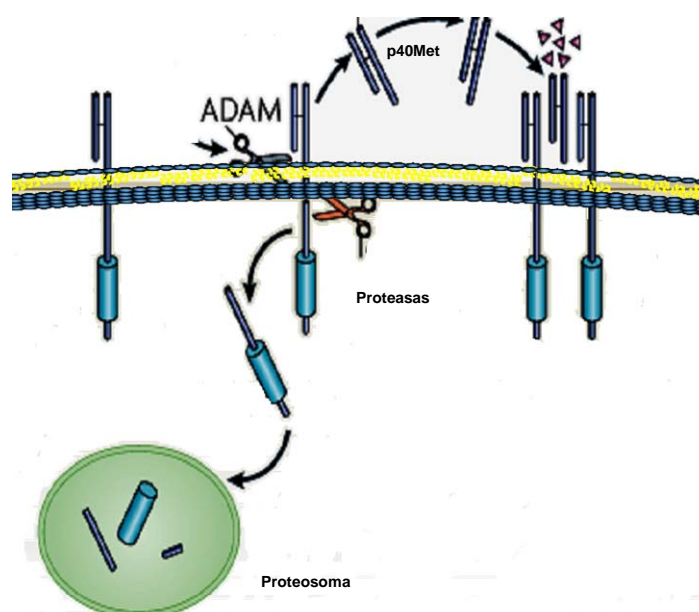
La trans-fosforilación del sitio de anclaje de Met conlleva a la asociación de STAT-3 en este sitio y posterior fosforilación en tirosinas dependiente de Met. Una vez fosforilado STAT-3 se disocia del receptor y forma homodímeros a través de su dominio SH2 (Boccaccio et al. 1998) que se traslocan al núcleo, donde operan como factores de transcripción que regulan la expresión de varios genes implicados en la proliferación o diferenciación celular y morfogénesis (Figura.18) [(revisado por (Birchmeier and Gherardi 1998; Gao and Vande Woude 2005)].

### 7.5 Complejo I $\kappa$ B $\alpha$ -NF- $\kappa$ B

El sistema NF- $\kappa$ B comprende una familia de factores de transcripción que se mantiene inactivo en el citoplasma por asociación con miembros una familia de proteínas inhibidoras conocidas como I $\kappa$ Bs. Estos inhibidores son ubiquitinizados y degradados, eventos disparados por fosforilaciones que se inician por la quinasa I $\kappa$ B (IKK). En respuesta a la activación de Met, la activación de IKK es mediada por la vía PI3K-AKT y Src como intermediarios de la señalización, pero los efectores directos de la estimulación de IKK no se conocen (Karin et al. 2002; Fan et al. 2005). Como indica la figura 18, la degradación de I $\kappa$ Bs inducida por IKK libera NF- $\kappa$ B que se trasloca al núcleo para inducir la transcripción de varios genes que regulan la actividad mitogénica y anti- apoptótica ( Figura 18) (Muller et al. 2002).

## 7.6 Regulación de los niveles de Met.

Met es sobreexpresado frecuentemente en las células tumorales, pero los factores que inducen o mantienen estos niveles elevados no son completamente conocidos. Al igual que la mayoría de los receptores tirosina quinasas, el receptor Met requiere mecanismos de activación seguidos de inactivación para evitar la señalización persistente o continua. En ausencia de estos mecanismos, persiste la señalización de Met y puede conllevar a la transformación celular y el incremento de la invasión y metástasis de tumores establecidos, hasta incluso en ausencia de ligandos. Este fenómeno se ha demostrado en el reordenamiento cromosómico inducido por carcinógeno donde se genera la proteína truncada TPR-Met (TPR-Met) (Park et al. 1987). La proteína resultante carece del dominio juxtamembrana requerido para la ubiquitinización y degradación regulada. La exclusión de la vía degradativa endocítica define la activación constitutiva y, por tanto, las propiedades oncogénicas de esta proteína Met mutante (Mak et al. 2007). TPR-Met ilustra la importancia de un número de estrategias moleculares que son útiles para evitar la actividad oncogénica de Met, como son: **proteólisis, regulación transcripcional, defosforilación enzimática e internalización.**



**Figura 19. Regularización de Met. Proteólisis.**

La **hidrólisis proteolítica** es un mecanismo de regulación de Met, donde las caspasas pueden hidrolizar Met, separando el dominio intra y extra celular, formando un fragmento proapoptótico llamado p40 Met [(Nath et al. 2001; Schelter et al.) 2010]. Además, alguna metaloproteasa, específicamente ADAM17 de la familia “desintegrina y metaloproteasa”, produce liberación del ectodominio del receptor el cual puede actuar como un fragmento que

compite con el ligando, de este modo se consigue la regulación negativa (Tulasne et al. 2004) (Figura.19). Muchas proteasas de estructuras similares tienen potentes efectos de supervivencia y proinvasivos dentro del tumor, por tanto se debe tener especial cuidado en el desarrollo de la terapéutica, subrayando la importancia de una comprensión más profunda de la biología básica.

**El control transcripcional** es esencial para regular la función de Met. Un número de factores transcripcionales incluyendo SAP1, Pax3, Ets1, p53, Smad y Spl se han identificado como reguladores positivos del promotor de Met, así como HIF-I bajo condiciones de hipoxia (Gambarotta et al. 1994; Pennacchietti et al. 2003; Boccaccio and Comoglio 2006).

**Post-transcripcionalmente**, la actividad de Met también puede ser regulada por **fosfatasas**. La fosforilación de un residuo de serina (Ser 985) localizado en la región yuxtamembrana, por la proteína quinasa C (PKC) y proteínas quinasas dependientes de calcio, inhibe la fosforilación en tirosina de la subunidad  $\beta$  del receptor y por tanto la actividad tirosina quinasa de Met [Comoglio, 1993; Bardelli et al., 1994].

Finalmente, Met es regulado por la **internalización y degradación del receptor**. El HGF estimula de forma rápida la endocitosis del receptor Met a través de un mecanismo dependiente de vesículas cubiertas con clatrina (Gandino et al. 1994; Hammond et al. 2001; Mosesson et al. 2008). El dominio SH3 de Grb2 atrae a ligasa de ubiquitina CBL (*Casitas B-lineage Lymphoma*) hacia el receptor. (Peschard et al. 2001). CBL se asocia con un complejo de endofilina regulador de clatrina y CINS5 para atraer a Met dentro de las vesículas cubiertas con clatrina y promover invaginación y escisión (Petrelli et al. 2002; Li et al. 2007). Por tanto, CBL facilita la ubiquitinización del receptor con lo cual promueve la degradación lisosomal y proteosomal, y dirige el receptor a las vesículas cubiertas con clatrina para internalizarlo y atenuar la señalización (Raiborg et al. 2003; Bonifacino and Rojas 2006). (Figura. 20).

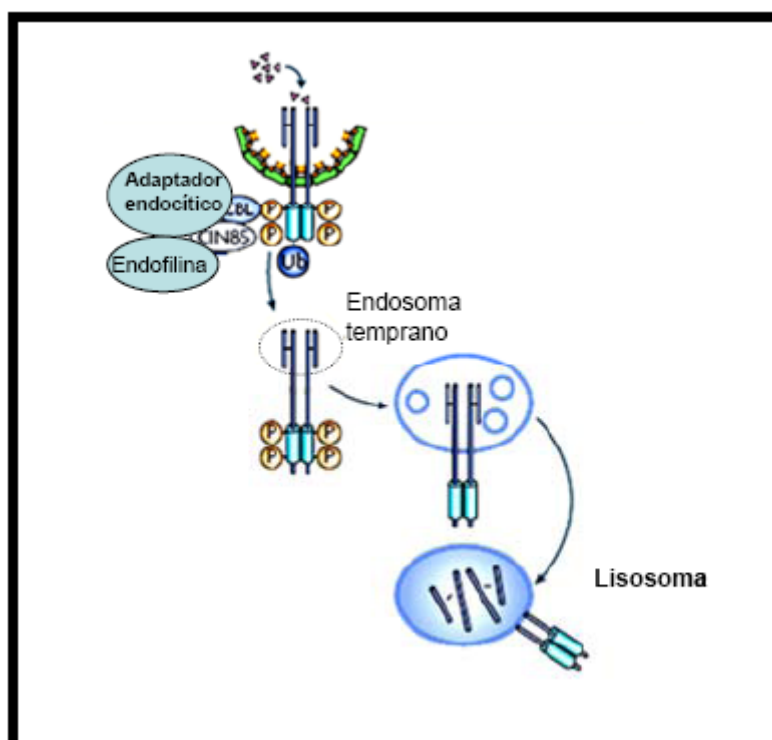


Figura 20. Internalización y degradación de Met.

## 8. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS INDUCIDAS POR HGF/MET.

El HGF es una molécula multifuncional que ejerce una gran variedad de efectos sobre las células epiteliales. Así, induce mitogénesis, motogénesis, morfogénesis, tubulogénesis, polarización celular, promueve la invasión, e inhibe la apoptosis (revisado por (Comoglio and Trusolino 2002; Birchmeier et al. 2003; Rosario and Birchmeier 2003; Zhang and Vande Woude 2003; Tulasne and Foveau 2008)).

### 8.1 HGF/Met y el hígado

En el hígado, el HGF es principalmente conocido por ser un potente mitógeno en hepatocitos tanto *in vivo* como *in vitro* (Nakamura et al. 1984; Russell et al. 1984; Fabregat et al. 1992) y un inductor de la regeneración hepática (Michalopoulos and DeFrances 1997; Fausto 2000). Además, promueve la supervivencia de hepatocitos adultos y embrionarios (Kosai et al. 1998; Moumen et al. 2007). Esta actividad antiapoptótica parece contribuir de forma muy importante a los efectos hepatotróficos, en particular, su capacidad para atenuar la fibrosis y cirrosis, y otras disfunciones hepáticas (Ogasawara et al. 1993; Kosai et al. 1999; Ueki et al. 1999; Phaneuf et al. 2000). La generación de modelos de ratón deficientes en HGF o Met ha permitido demostrar un papel crítico para esta ruta de señalización durante el desarrollo del hígado (Bladt et al. 1995; Schmidt et al. 1995; Uehara et al. 1995). Varios laboratorios han

proporcionado evidencias directas de un papel esencial para la ruta HGF/Met durante la regeneración hepática, mediante la generación y el estudio de modelos de ratón *knock-out* condicionales de Met en hígado (Huh et al. 2004; Borowiak et al. 2004; Phaneuf et al. 2004). Estos modelos han revelado que este sistema ligando/receptor es crítico no solo para inducir la proliferación de los hepatocitos, sino también e incluso más importante, para proteger a los hepatocitos frente a la apoptosis y para promover la remodelación tisular. Aunque también, en el contexto hepático, se han descrito alteraciones de la vía de señalización de HGF/Met asociadas al hepatocarcinoma celular, que incluyen mutaciones activadoras, amplificación y sobreexpresión del ligando y del receptor, el papel que juega dicha ruta de señalización no está completamente esclarecido, existiendo evidencias controvertidas que apuntan tanto a un papel supresor como promotor tumoral (Sanchez and Fabregat 2009).

Aparte de sus efectos directos sobre hepatocitos, a lo largo de los años se han ido acumulando numerosas evidencias de un papel importante para la ruta HGF/Met en la biología de las células progenitoras hepáticas. Las células ovals expresan Met, entre otros receptores para factores de crecimiento (Hu et al. 1993). Además, durante la activación *in vivo* del compartimento de células ovals, en el modelo de daño hepático en rata conocido como AAF/PH, se observa un incremento significativo de la expresión de HGF coincidiendo con la proliferación de las células ovals, principalmente en las regiones periportales donde se localizan estas células (Nagy et al, 1996). La infusión de HGF durante la regeneración hepática inducida por AAF/PH acelera la proliferación *in vivo* de las células ovals (Nagy et al. 1996; Shiota et al. 2000). Por otra parte, se han documentado respuestas mitogénicas y morfogenéticas en células progenitoras hepáticas *in vitro* (Johnson et al. 1993; Okano et al. 2003). Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la ruta de señalización dependiente de Met es esencial para promover la supervivencia de células ovals *in vitro*, efecto que parece estar mediado a través de un mecanismo autocrino (del Castillo et al, 2008), resultados que sugieren que la actividad antiapoptótica de Met podría ser fundamental durante la expansión *in vivo* de las células ovals tras un daño tisular para permitir a las células superar las señales inhibitorias y citotóxicas.

### 8.2 HGF/Met y su papel en regeneración de tejidos.

En condiciones fisiológicas, la ruta de señalización de HGF/Met tiene un papel fundamental en el desarrollo y regeneración de órganos epiteliales, contribuyendo al establecimiento de la arquitectura tisular mediante la coordinación de distintos procesos, entre los que destacan, la proliferación celular, ruptura de las uniones intercelulares, migración a través de la matriz extracelular y protección frente a apoptosis. Ratones deficientes en HGF o

Met mueren durante el desarrollo embrionario y presentan graves alteraciones en la placenta y el hígado, dos órganos en los que se da la mayor expresión de HGF durante el desarrollo del ratón, demostrando que los hepatocitos y los trofoblastos placentarios necesitan HGF para crecer y sobrevivir (Bladt et al. 1995; Schmidt et al. 1995; Uehara et al. 1995).

Diferentes trabajos han indicado también que el HGF tiene diversos efectos durante el proceso de cierre de herida (revisado por (Conway et al. 2006). Éste es un proceso de regeneración de tejido rigurosamente controlado donde participan tres distintas fases superpuestas: **1. Homeostasis e inflamación, 2. Proliferación y 3. Maduración o remodelación.** Estas fases requieren un número esencial de eventos celulares y moleculares moduladas por el HGF, incluyendo migración celular, proliferación, angiogénesis, deposición y degradación de la ECM y modulación de la respuesta inmune(Jiang and Harding 1998).

De esta manera, el HGF es capaz de regular procesos angiogénicos y acelerar la reparación de tejidos después de una herida. (Bennett and Schultz 1993; Matsumoto et al. 1991) y revisado por ((Nakamura and Mizuno)2010). (Sengupta et al. 2003). (Bevan et al. 2004). El HGF como factor angiogénico actúa estimulando la proliferación de la célula endotelial y su motilidad *in vitro*, combinando así las propiedades adhesivas de las células endoteliales para facilitar la formación de los túbulos capilares ((Grant et al. 1993), (Rosen et al. 1990)).

Finalmente el HGF y Met controlan la migración de los precursores musculares y juegan un papel en el desarrollo del sistema nervioso y la remodelación ósea (Bladt et al. 1995; Brand-Saberi et al. 1996; Maina et al. 1996; Birchmeier and Gherardi 1998; Maina et al. 2001) y revisado por (Birchmeier et al. 2003). La participación del HGF en la remodelación del tejido puede en parte reflejar los efectos **morfogenéticos** del HGF. La remodelación del tejido se observa tanto en procesos fisiológicos como en patológicos, y se caracteriza por dos cambios esenciales: las células sufren EMT y se produce degradación de la ECM que abre vía para la migración celular (Lee et al. 2000).. El intercambio de señales entre los compartimentos de células epiteliales y mesenquimáticas es crítico durante el crecimiento, la diferenciación, y morfogénesis, de distintos tipos de órganos. Se cree que la señalización de HGF/Met podría jugar un papel relevante como mediadora de estas interacciones epitelio-mesénquima (revisado por (Birchmeier and Gherardi 1998).

### **8.3 HGF/Met y su papel en la respuesta morfogenética.**

La **respuesta morfogenética inducida por el HGF es una respuesta única**, y una de las más estudiadas (Montesano et al. 1991). En presencia de HGF, un gran número de células



epiteliales forman estructuras tridimensionales complejas y ordenadas, entre las que destacan la formación de túbulos ramificados similares a los que se encuentran en órganos epiteliales, tales como el riñón o la glándula mamaria, respuesta muy compleja que implica a su vez múltiples procesos que van desde cambios en la polaridad y adhesión celular, migración, proliferación, diferenciación y apoptosis, (revisado por (Rosario and Birchmeier 2004; Karihaloo et al. 2005)). Esta respuesta morfogenética inducida por el HGF, tiene un particular impacto en la célula y en la biología del desarrollo de diferentes órganos (revisado por (Birchmeier and Gherardi 1998; Matsumoto and Nakamura 1996).

Por otra parte, se reconoce que la morfogénesis de los tejidos epiteliales requiere una interacción con el mesénquima adyacente (durante el desarrollo embrionario) o con el estroma adyacente (durante la vida postnatal), lo que se conoce como interacción epitelio - mesénquima. Sin embargo, no se había identificado al HGF como molécula relacionada con la morfogénesis epitelial; pero posteriormente, la implicación del HGF en la morfogénesis epitelial se puso de manifiesto mediante la realización de experimentos de cultivos de órganos: la incubación con anticuerpos contra el HGF tuvo como resultado la inhibición de la formación de túbulos ramificados en las células epiteliales del riñón y la glándula mamaria [(revisado por (Nakamura et al.) 2011)].

Estas interacciones entre el epitelio y el mesénquima, son un aspecto crucial del desarrollo, que afecta la inducción del tejido y la morfogénesis epitelial. Como hemos mencionado anteriormente, durante el desarrollo de varios tejidos, Met es expresado en el epitelio, mientras que el HGF en células mesenquimales muy cerca de varios órganos. Estos patrones de expresión indican que el HGF es un factor derivado del mesénquima que predominantemente actúa cerca de los lugares de desarrollo de epitelios. (Birchmeier and Gherardi 1998). Por tanto el HGF juega un papel importante como factor derivado del mesénquima que regula el crecimiento epitelial y la morfogénesis.

Con respecto a la inducción de proteasas, también son importantes para la respuesta morfogenética del HGF, así para la formación de túbulos ramificados por el HGF la activación del plasminógeno tipo uroquinasa y la MMP1 (*matrix metalloproteinase 1*) juegan un papel importante (Karihaloo et al. 2005). Por consiguiente, la promoción de la proliferación celular, migración y morfogénesis en 3D por el HGF explica la recuperación y reorganización de los tejidos después de una lesión; también podemos decir que el sistema HGF/Met impulsa la degradación de la matriz extracelular junto con la migración celular, mitogénesis y morfogénesis, dando lugar a la construcción de la arquitectura del tejido, es decir, la vía HGF/met promueve una respuesta morfogenética completa.

## 8.4 HGF/Met y motilidad celular

El citoesqueleto está constituido por una red de proteínas fibrosas del citoplasma que proveen el soporte interno para las células, anclan las estructuras internas de la misma e intervienen en los fenómenos de movimiento celular y en su división. Es una estructura dinámica que mantiene la forma de la célula, facilita la motilidad e invasión celular y desempeña un importante papel tanto en el transporte intracelular, como en la señalización celular. La reorganización del citoesqueleto en la célula contribuye a la motilidad celular y a la migración. Tanto las integrinas (receptores de adhesión) como los factores de crecimiento y citoquinas pueden modular la motilidad, migración y aún la invasión celular.

La motilidad celular compromete la formación y retracción de filopodia y lamelipodia así como alteración en la formación de actina. Esta red de actina en el citoesqueleto tiene que ser muy dinámica para adaptarse a la alteración de la forma celular, adhesiones y des-adhesiones durante la motilidad y migración celular. (Weisberg et al. 1997). Entre las proteínas importantes en la motilidad celular tenemos los receptores de adhesión (las integrinas), las proteínas de adhesión focal, proteínas adaptadoras tales como Crk and CRKL, PI3K (tirosina quinasa no receptores), y complejos de cadherina/catenina (Revisado por ((Ma et al. 2003).

La vía de señalización HGF/Met incrementa la motilidad de las células epiteliales, Por ejemplo, se ha demostrado que la motilidad de las células SCLC (de células pequeñas de cáncer de pulmón) es incrementada por HGF (Maulik et al. 2002). Asimismo, la activación de Met induce motilidad de las células MDCK (Madin-Darby canine kidney). Además, las señales generadas por el receptor tirosina quinasa Met modifica la fosforilación de las principales proteínas estructurales y regulatorias del citoesqueleto como vemos en la actividad catalítica de p125FAK, SH2 contenida en tensina, y el dominio multifuncional LIM contenido en paxilina (Weisberg et al. 1997).

La regulación de la motilidad celular es rigurosamente controlada por PI3K y pequeñas GTPases incluyendo Ras, Rac y Rho (Nobes and Hall 1995). Numerosas evidencias indican que la ruta de PI3K favorece la mito, moto y morfogénesis. Por ejemplo, se ha demostrado que la inhibición de PI3K por wortmanina conduce a la disminución de la formación de ramificaciones en las matrices de colágeno y disminución de la quimiotaxis de las células [Revisado por (Ma et al. 2003). Por otro lado, se ha observado que el HGF induce disociación y motilidad de las células epiteliales de forma similar a las semaforinas (Stella and Comoglio 1999). Este proceso de **dispersión celular** se ha demostrado en una variedad de tipos celulares e incluye tres fases llamadas: **1.** Dispersión celular. **2.** Disociación célula-célula y **3.** Migración celular. Para que las células epiteliales se dispersen, es necesaria la atenuación de las adhesiones celulares; lo cuál

ocurre en algunas etapas durante el desarrollo normal así como también en la invasión de la célula tumoral y metastasis.

### 8.5 HGF/Met y cáncer

Se ha descrito la sobreexpresión tanto de HGF como de Met en distintos tipos de tumores, incluyendo los carcinomas hepatocelulares; así como la activación constitutiva de Met, bien a través del establecimiento de un *loop* autocrino, o a través de la sobreexpresión o la mutación de Met. En definitiva, la **activación inapropiada de la ruta HGF/Met parece estar implicada en la formación y progresión tumoral**, contribuyendo al crecimiento, la supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis de una gran variedad de tumores sólidos. De particular relevancia es su papel en el control del “crecimiento invasivo” del tumor, fenómeno que comprende varios procesos biológicos, como son, la capacidad de la célula neoplásica para migrar e invadir tejidos adyacentes, sobrevivir en los nuevos compartimentos y proliferar, para finalmente establecerse en sitios distantes del tumor original. Estos efectos se deben en gran medida a su capacidad para mediar interacciones entre el tumor y el estroma, un escenario que, aún siendo totalmente distinto, recuerda o emula las interacciones epitelio-mesénquima implicadas en la morfogénesis y regeneración/reparación tisular, (revisado por (Vande Woude et al. 1997; Comoglio and Trusolino 2002; Birchmeier et al. 2003; Matsumoto and Nakamura 2006; Benvenuti and Comoglio 2007)). Por todo esto, la señalización de Met es una diana potencial de la terapia antitumoral.

## 9. RESULTADOS PUBLICADOS DEL GRUPO RELATIVOS AL MODELO CELULAR UTILIZADO EN ESTE ESTUDIO

Teniendo en cuenta el papel fundamental de la ruta HGF/Met en la regeneración hepática y las recientes evidencias de sus efectos tróficos potenciales en las células progenitoras hepáticas (descritos en la introducción de esta memoria), hace más de nueve años nuestro grupo de investigación inició una nueva línea de investigación enfocada a estudiar la relevancia de la señalización HGF/Met en la biología de las células progenitoras y sus implicaciones en la fisiología y patología hepáticas, usando un nuevo modelo de ratón *knock out* condicional de Met desarrollado en el laboratorio del Dr. S.S. Thorgeirsson: (Huh et al. 2004). Para llevar a cabo un análisis más directo y molecular de los mecanismos que subyacen las actividades ejercidas por HGF/Met en las células progenitoras hepáticas establecimos varias líneas celulares clonales procedentes de células ovas inducidas por tratamiento con 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC), que expresan una forma funcional (células Met<sup>flx/flx</sup>), o no funcional (células Met<sup>-/-</sup>) de Met, usando el sistema de modificación genética Cre-loxP y la consiguiente

recombinación mediada por adenovirus. La caracterización funcional de las líneas de células ovals nos ha permitido demostrar que en ausencia de la actividad tirosina quinasa de Met, no se ve afectada la capacidad proliferativa celular, pero se produce un incremento de la sensibilidad basal a la apoptosis inducida por la privación de suero y tratamiento con TGF- $\beta$ . El pretratamiento con HGF exógeno reduce significativamente la respuesta apoptótica inducida por TGF- $\beta$  en células Met<sup>flx/flx</sup>, pero no en células Met<sup>-/-</sup>. También hemos evidenciado la regulación autocrina de HGF/Met en las células ovals; hecho que es apoyado por la expresión constitutiva del HGF, una actividad antiapoptótica del medio condicionado libre de suero de las células ovals sobre las células Met<sup>flx/flx</sup> y la activación persistente de Met en las células Met<sup>flx/flx</sup>. En conclusión, nuestros datos revelan un papel crítico de Met en la supervivencia de las células ovals a través de un mecanismo autocrino (del Castillo et al. 2008). Estas células han probado ser una herramienta muy valiosa para definir los mecanismos moleculares de la señalización de HGF/Met en células progenitoras hepáticas. Nuestro propósito es explotar este nuevo modelo para caracterizar en profundidad la multifuncionalidad de esta ruta de señalización en las células ovals.



## **II. OBJETIVOS**



En base a los datos de la literatura que sustentan un papel crítico para la ruta de señalización de HGF/c-Met en la regeneración hepática, y más concretamente sus efectos directos en la regulación de la biología y función de las células progenitoras hepáticas, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Analizar el papel de la ruta HGF/c-Met en la regulación de la capacidad migratoria e invasiva de las células ovals, utilizando un modelo *in vitro* de líneas de células ovals que expresan una forma normal o mutante de c-Met, sin actividad tirosina quinasa (células Met<sup>flx/flx</sup> y células Met<sup>-/-</sup>, respectivamente).
2. Definir los mecanismos a través de los cuales la ruta HGF/c-Met modula la motilidad e invasividad de las células progenitoras hepáticas.

Para ello, hemos desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- Análisis del efecto del HGF en la migración basal de células ovals; así como la migración e invasión a través de matriz extracelular; y la migración dirigida al cierre de herida.
- Caracterización del efecto motogénico de la ruta HGF/c-Met en células ovals, en relación a la organización del citoesqueleto de actina, expresión y localización de proteínas de unión célula-célula, existencia o no de un proceso de transición epitelio mesénquima, y la posible polarización celular.
- Identificación de las rutas de señalización que median los procesos de migración e invasión inducidos por HGF en células ovals.
- Análisis del efecto del HGF sobre la expresión génica de moléculas de adhesión y matriz extracelular inducida en células ovals.





### **III. MATERIALES Y METODOS**



## 1. CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Las líneas de células ovals  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  y  $\text{Met}^{-/-}$  usadas en este trabajo proceden de un modelo de ratón *knock-out* condicional para *Met*, generado mediante el sistema de modificación genética *Cre-loxP*, en el laboratorio del Dr. Thorgeirsson (NIH, Bethesda, EE.UU.). Para la activación y expansión *in vivo* de las células ovals  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  se utilizó el modelo *in vivo* de daño hepático crónico basado en el tratamiento con 0.1% de DDC (Preisegger et al. 1999). Las líneas clonales de células  $\text{Met}^{-/-}$  se generaron a partir de las células  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  por infección con un adenovirus que expresa la *Cre* recombinasa bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) (Ad-CMV-*Cre*) (Vector Biolabs). Estas células expresan un receptor *Met* que carece de actividad tirosina quinasa y, por lo tanto, no es funcional. La descripción detallada del aislamiento y subclonaje de las células, así como la caracterización fenotípica y validación funcional del modelo celular se encuentra en (del Castillo et al. 2008).

La línea de hepatocitos neonatales inmortalizados de ratón se generó en el laboratorio de la Dra. Angela M. Martínez Valverde, a partir de cultivos primarios de hepatocitos neonatales de 3- 5 días de vida, según lo descrito en (Fabregat et al. 1989) y (Valverde et al. 2003).

### 1.1 Condiciones del cultivo.

Las células se mantuvieron en cultivo en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con un 10% de FBS (Suero Fetal Bovino), glutamina (1mM), penicilina (120  $\mu\text{g/ml}$ )-estreptomicina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y anfotericina B (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ), en condiciones de temperatura (37°C), humedad (80%) y atmósfera de  $\text{CO}_2$  (5%) controladas. El medio se renovó completamente cada 48-72 horas y las células se tripsinizaron y subcultivaron cuando alcanzaron el 80-90% de confluencia. Los experimentos se realizaron durante los primeros pases (pases 2-8) utilizando diferentes tipos de platos de cultivo en función del experimento a realizar (Tabla I).

**Tabla I. Tipos de placa de cultivo celular**

<i>Placa de cultivo</i>	<i>Área</i>	<i>Volumen de Medio</i>
10 cm	58.95 $\text{cm}^2$	10 ml
60 cm	21.29 $\text{cm}^2$	3 ml
35 cm	11.78 $\text{cm}^2$	1.5 ml
<i>Multiwell</i> de 24	2.0 $\text{cm}^2$	0.5 ml

## 1.2 Factores de crecimiento e inhibidores utilizados.

Los factores de crecimiento e inhibidores utilizados en este trabajo aparecen en la tabla II. Antes de realizar los tratamientos se dejaban las células en ausencia de suero entre 2 y 12 horas. Los inhibidores se añadían entre 30 minutos y 1 hora antes de la adición de los factores de crecimiento.

**Tabla II. Factores de Crecimiento e Inhibidores**

<i>Factores de crecimiento o Inhibidores</i>	<i>Concentración</i>	<i>Casa comercial</i>
HGF	40 ng/ml	R&D Systems
TGF- $\beta$	2ng/ml	Calbiochem
LY 294002	5 $\mu$ M	Calbiochem
SB 203580	10 $\mu$ M	Calbiochem
UO126	5 $\mu$ M	Sigma Aldrich

## 2. ENSAYOS DE “SCATTER” O DISPERSIÓN CELULAR.

Las células se sembraron en platos de cultivo de plástico de área 11,78 cm<sup>2</sup> a una densidad baja (3400 células/cm<sup>2</sup>), con el fin de que crecieran en forma de pequeñas colonias aisladas, y se incubaron en DMEM suplementado con 10%FBS. 24 horas más tarde, se visualizó el cultivo y se seleccionaron varias zonas correspondientes a colonias pequeñas de células y se cambió el medio a DMEM 0% FBS suplementado o no con 40 ng/ml HGF (recombinante de ratón, R&D). Se realizó un seguimiento de la evolución del cultivo usando un microscopio de contraste de fases (Eclipse TE300, Nikon) y con una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon digital sight DS-U2) se tomaron fotografías de las zonas seleccionadas a diferentes tiempos de tratamiento (0, 6, 16, 48h).

### 2.1 Video-microscopía del ensayo de “scatter”.

Las células ovales fueron crecidas en placas *multiwell* de 6 pocillos en las mismas condiciones que en el ensayo de *scatter* en placa. Para la filmación, se incubaron en medio DMEM 0% FBS, con o sin HGF (40ng/ml), durante un tiempo total de 48 horas de grabación en un microscopio Leica AF6000 LX provisto de una cámara (Hamamatsu C9100-02) cerrada con temperatura y humedad constantes que permitían a las células mantenerse vivas en cultivo (37°C y 5%CO<sub>2</sub>). Las imágenes fueron adquiridas con el objetivo 10X.

Posteriormente, los videos fueron montados y procesados utilizando el *software MetaMorph* 6.1r6 (Universal Imaging).

### **3.0 ENSAYOS *IN VITRO* DE CICATRIZACIÓN O CIERRE DE HERIDA (“WOUND HEALING”).**

Las células se sembraron a confluencia, a una densidad de 34000 células/cm<sup>2</sup>, en DMEM suplementado con 10%FBS y 24 horas más tarde se realizó una “herida” perpendicular en la zona central del plato de cultivo mediante una punta de pipeta estéril. Una vez realizada la herida, las células se lavaron varias veces con PBS 1X para asegurar la eliminación de todas las células levantadas y/o muertas, reemplazándose el medio por DMEM 0% FBS o DMEM 2% FBS, para las células ovales o hepatocitos neonatales, respectivamente. Las células se estimularon con HGF (40 ng/ml), en presencia o ausencia de inhibidores, LY294002 (5μM), SB203580 (10μM), UO126 (5μM), incubándose durante 48 horas. Las células control se sometieron al mismo proceso pero se incubaron sin adición de HGF o inhibidores.

La migración de las células a través de la herida se monitorizó mediante un microscopio de contraste de fases (Eclipse TE300, Nikon) y con una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon digital sight DS-U2) se tomaron fotografías con un objetivo 10X a tiempo 0 (momento en el que se realizó la herida) y tras 48 horas de incubación. Para calcular la eficiencia del cierre de la herida en las distintas condiciones de cultivo se midió el área de la herida a los tiempos inicial (0h) y final (48h), utilizando el programa imageJ. Los resultados se expresan como porcentaje de cierre a las 48h respecto al tiempo 0.

### **4. ENSAYOS *IN VITRO* DE MIGRACIÓN E INVASIÓN.**

Para evaluar el efecto pro-migratorio y pro-invasivo del HGF en las células ovales se utilizaron cámaras *transwell* de cultivo celular (BD), que están constituidas por un inserto o cámara superior provista de un filtro de policarbonato con poros de 8 μm de diámetro, los cuales permiten que las células puedan atravesarlo libremente, y una cámara inferior correspondiente al hueco que queda en el pocillo de la placa *multiwell* de 24 pocillos (BD), tras colocar el inserto (*Figura 21*). La cara superior del filtro se cubrió con Colágeno IV (Proteína de la membrana basal) o con Matrigel (ambas de BD).

El Matrigel es una membrana basal biológicamente reconstituida derivada del tumor Englebreth-Holm-Swarm (EHS) murino, que simula la membrana basal presente *in vivo*. El Matrigel contiene colágeno IV, laminina, entactina, heparán sulfato, trazas de factores de crecimiento y proteoglicanos (Albini y Noonan, 2010). Previamente al ensayo, las células se sembraron a confluencia ( $34000/\text{cm}^2$ ) en platos de cultivo de plástico en DMEM suplementado con 10% FBS. Al día siguiente se privaron de suero durante 2 horas, y posteriormente se tripsinizaron y se sembraron las células en el compartimento superior de las cámaras *transwell* en DMEM 0% FBS 0,1% BSA (Albúmina Sérica Bovina) suplementado o no con HGF (40 ng/ml) y/o inhibidores LY294002 ( $5\mu\text{M}$ ), SB203580 ( $10\mu\text{M}$ ), UO126 ( $5\mu\text{M}$ ). En el compartimento inferior se añadió DMEM 0% FBS.

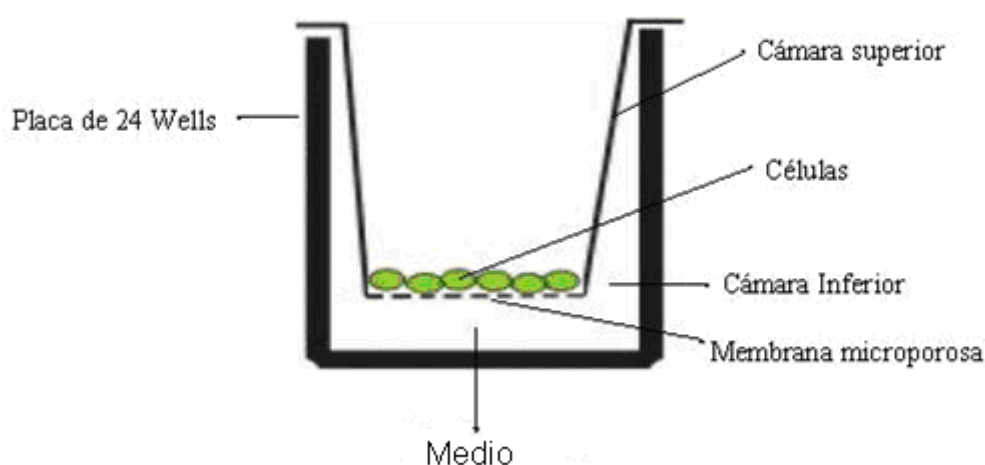


Figura. 21. Esquema de la cámara de cultivo celular *Transwell* provista de una membrana microporosa ( $8\mu\text{m}$  de diámetro del poro)

### 4.1 Pretratamiento de los insertos para los experimentos de migración/invasión.

Para los ensayos con colágeno IV se cubrió la membrana de policarbonato de los insertos con  $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de colágeno IV resuspendido en HCL 0,01 N y se colocaron en las placas *multiwell* de 24 pocillos. A continuación se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en condiciones estériles, posteriormente se lavaron con PBS1X frío. Seguidamente se sembraron las células ( $50000\text{ células}/\text{cm}^2$ ) en la cámara superior en medio DMEM 0% FBS 0,1% BSA en presencia o ausencia de HGF. Dejamos transcurrir la migración a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  durante 24 horas.

Para los ensayos con matrigel se añadió a los insertos  $100\mu\text{l}$  Matrigel frío ( $30\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en DMEM 0% FBS, en la cara superior del filtro. Esta capa de Matrigel se dejó solidificar durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  y antes de sembrar las células se rehidrató con DMEM 0% FBS. En el compartimento inferior se añadió DMEM 0% FBS. Una vez añadimos las células ( $50000/\text{cm}^2$ )

en medio DMEM 0% FBS 0,1% BSA en la cámara superior, se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

#### **4.2 Fijación y tinción de los filtros para el análisis cuantitativo.**

Tras 24 horas de incubación a 37° C y 5% CO<sub>2</sub>, los insertos de cámaras *transwell* se lavaron varias veces con PBS 1X y las células se fijaron y tiñeron con cristal violeta (solución al 0,2% en 2% etanol) durante 20 minutos y se dejaron secar al aire. Las células que no habían atravesado el filtro y que permanecían en la cara superior del filtro se eliminaron con un bastoncillo y se cuantificó el número de células que habían pasado a la cara inferior del filtro, usando un microscopio de luz directa (Eclipse TE300, Nikon) y un objetivo 60X. Se tomaron imágenes de campos representativos de los filtros correspondientes a las distintas condiciones de cultivo, mediante una cámara digital acoplada al microscopio (Nikon digital sight DS-U2), usando un objetivo 10X. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-PCR (*REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION*).**

Tras incubar las células con los tratamientos correspondientes, se retiró el medio de cultivo por aspiración y se lavaron las placas dos veces consecutivas con PBS1X frío. Posteriormente, se procedió a aislar el RNA utilizando el sistema comercial RNeasy mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, incluida la digestión con DNasa (Quiagen) y se guardó a -80°C. Para la valoración de la concentración y pureza del RNA, se realizó una lectura espectrofotométrica por duplicado a 260, 280 y 310 nm. La lectura a 260 permitió calcular la concentración del ácido nucleico en la muestra; 280 nm es el pico de absorción de las proteínas, por lo que la relación entre las absorbancias A260/A280 daba idea del grado de contaminación de proteínas que tenían las muestras; en este sentido, se consideraba que una relación de 1,8-2 es indicativa de un buen grado de pureza del RNA. La lectura a 310 nm se corresponde a la absorbancia debida a otras impurezas. La valoración cuantitativa de los ácidos nucleicos aislados se realizó teniendo en cuenta que una unidad de D.O. a 260 nm se corresponde con 40 µg/ml de RNA (Sambrook et al, 1989).

#### **5.1 La síntesis de cDNA.**

El cDNA se obtuvo mediante una reacción de retrotranscripción a partir de RNA. La reacción se llevó a cabo a partir de 1µg de RNA. En primer lugar se eliminaron las posibles estructuras secundarias formadas en el RNA, mediante calentamiento a 65°C durante 5 minutos, en presencia de 0,25 µg de cebador oligo-dT (Amersham Biosciences) y dNTPs 0,5



mM (Invitrogen). Posteriormente, se incubó durante 1 h a 50°C en presencia de 200 unidades de retrotranscriptasa (Superscript III RNase H Reverse Transcriptase, Invitrogen), DTT 5 mM y 40 unidades de inhibidor de RNAsas (RNAsin, Promega). La reacción se detuvo inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos. El cDNA se guardó a -20°C.

### 5.2 Amplificación del cDNA por PCR.

El cDNA obtenido se amplificó por PCR. Dicha PCR se realizó a partir de 2 µl de la mezcla de la reacción anterior conteniendo el cDNA, en presencia de los cebadores o “*primers*” (1 µM) (Sigma), dNTPs (100 µM) (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), (Invitrogen), y 1 unidad de la polimerasa Ecotaq (Ecogen).

La reacción de PCR se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

- 1) 95°C durante 5 minutos (necesarios para asegurar la completa desnaturalización del DNA).
- 2) 35 ciclos a:
  - 94°C durante 0,5-1 minuto (desnaturalización del cDNA).
  - 60-62 °C (Tabla III), durante 30 segundos (durante esta etapa se produce la hibridación de los cebadores con su secuencia complementaria en el cDNA).
  - 72°C (Temperatura óptima de actividad de la Ecotaq. Es la denominada fase de extensión donde se produce la síntesis del producto de PCR) durante 0,5-1 minuto (dependiendo del tamaño del fragmento amplificado).
- 3) Elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1-1,5%, en tampón TAE 1X (Tris 40 mM; 0,1% Ácido acético glacial; EDTA 1 mM) conteniendo bromuro de etidio (1 mg/ml) y exposición a luz UV. 18S se utilizó como transcrito normalizador. Como control de especificidad se incluye una muestra que lleva RNA pero no retrotranscriptasa (indicado como -RT).

**Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para RT-PCR**

<i>Gen</i>	<i>Primer 5'</i>	<i>Primer 3'</i>	<i>T<sub>m</sub></i>	<i>Nº</i>
mr Snail	GCAGCTGGCCAGGCTCTCGGTGGC	GTAGCTGGGTCAGCGAGGGCCTCC	65	30
m E-cad	CGTGATGAAGGTCTCAGCC	ATGGGGGCTTCATTAC	64	30
m18s	GCGAAAGCATTGCGCAAGAA	CATCACAGACCTGTTATTGC	58	30

m= mouse (ratón)

r= rat (rata)

## 6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE QRT-PCR (*QUANTITATIVE REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION*).

Para estos ensayos, se partió del cDNA obtenido según se explica en el método anterior, tratando las muestras de RNA con DNAsa para evitar la presencia de posibles trazas de DNA genómico. Las reacciones de PCR se realizan por triplicado en placas de 384 pocillos, siendo el volumen total de reacción por pocillo de 10 µl. Como gen normalizador se utilizo Hsp90 (*Heat Shock protein 90*). La composición de la mezcla de reacción se detalla en la Tabla IV.

**Tabla IV. Componentes de la mezcla**

<b>Componentes de la mezcla</b>	<b>Volumen ( µl) por reacción</b>
cDNA	2,5
Cebador 3' (5µM)	0,6
Cebador 5' (5µM)	0,6
SYBR green master mix 2X	5
Agua libre de nucleasas	1,3
Volumen final	10

Se utilizó un equipo 7900 HT Fast Real-Time de Applied Biosystems, de los servicios de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid. Se realizaron 40 ciclos empleando una temperatura de hibridación de 58°C. En la Tabla V se indican las secuencias de los cebadores empleados.

**Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para QRT-PCR**

Gen	Primer 5'	Primer 3'
mCdh1	GCACATCCGAAGCCACACGC	GCGGTCAGCAAAAGCACGGT
mCol1a1	GTCGCTTCACCTACAGCACCT	AGGCGGGAGGTCTTGGTGGTTT
mCol6a1	ACCTCGGAGAGTGTGGCCTT	TAGTGCAGCGCACCCGCATT
mItga2	TGCAGGTTTGTGGAAGCTCGG	GTGCTGTCCGCCGATGGTTT
mItgb2	ACAGAGGTCGGCAAGCAACTGA	TGTGGCAAACACCAGCAGCCTC
mMmp10	AACACGGAGACTTTTACCCTTTT	GGTGCAAGTGTCCATTTCTCAT
mMmp13	TTGGTCCCTGCCCCTTCCCTAT	CGCAAGAGTCGCAGGATGGT
mSnail	GCACATCCGAAGCCACACGC	GCGGTCAGCAAAAGCACGGT

## 7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y ECM UTILIZANDO “ARRAYS” DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR CUANTITATIVA.

El análisis de la expresión de los 84 genes asociados a moléculas de adhesión y ECM en las células ovas Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup> se realizó usando Mouse Extracellular Matrix and Adhesion Molecules RT2 Profiler PCR Array- PAMM-013 (SuperArray Bioscience Corp., Frederick, MD, EE.UU) conforme a las instrucciones del fabricante. En la Tabla VI se presenta un listado de todos los genes incluidos en el *array* y en el Anexo I su descripción.

Tabla VI. Genes analizados en el array

Genes analizados	
Moléculas de adhesión celular	Proteínas de la Matrix extracelular (ECM)
<b>Moléculas transmembrana:</b> Cd44, Cdh1, Cdh2, Cdh3, Cdh4, Entpd1, Icam1, Itga2, Itga3, Itga4, Itga5, Itgae, Itgal, Itgam, Itgav, Itgb1, Itgb2, Itgb3, Itgb4, Mmp14, Mmp15, Ncam1, Ncam2, Pecam1, Sele, Sell, Selp, Sgce, Syt1, Vcam1 <b>Adhesión célula-célula:</b> Cdh1, Icam1, Vcam1 <b>Adhesión células - Matrix:</b> Ctgf, Itga2, Itga3, Itga4, Itga5, Itgae, Itgal, Itgam, Itgav, Itgax, Itgb1, Itgb2, Itgb3, Itgb4, Spp1. <b>Otras Moléculas de adhesión:</b> Ctnna1 (Catna1), Ctnna2 (Catna2), Ctnnb1 (Catnb), Cntn1, Col5a1, Col6a1, Vcan, Emilin1, Fn1, Hapln1, Lama1, Lama2, Lama3, Lamb2, Lamb3, Lamc1, Postn, Tgfbi, Thbs1, Thbs2, Thbs3, Vtn.	<b>Constituyentes de la membrana basal:</b> Col4a1, Col4a2, Col4a3, Entpd1, Itgb4, Lama1, Lama2, Lama3, Lamb2, Lamb3, Lamc1, Sparc, Timp1, Timp2, Timp3. <b>Collagens and ECM Structural Constituents:</b> Colla1, Col2a1, Col3a1, Col4a1, Col4a2, Col4a3, Col5a1, Col6a1, Hapln1, Lama1. <b>Proteasas de la ECM:</b> Adamts1, Adamts2, Adamts5, Adamts8, Mmp10, Mmp11, Mmp12, Mmp13, Mmp14, Mmp15, Mmp1a, Mmp2, Mmp3, Mmp7, Mmp8, Mmp9. <b>Inhibidores de proteasas de la ECM :</b> Col4a3, Timp1, Timp2, Timp3. <b>Otras Moléculas de la ECM:</b> Vcan, Ctgf, Ecm1, Emilin1, Fbln1, Fn1, Hc, Postn, Spock1, Spp1, Tgfbi, Thbs1, Tnc.

## 7.1 Amplificación del cDNA

El cDNA fue preparado a partir de 1 µg de RNA total utilizando el kit RT2 PCR (array first strand kit RT2 First strand C-03). La mezcla para la reacción de RT se preparó de acuerdo al esquema presentado en la Tabla VII. Para la amplificación por PCR se empleó las siguientes condiciones: 95 °C / 10 min seguido por 40 ciclos de 95 °C / 15 min y 60°C / 1 min. Se realizó una mezcla con 2 µl de cDNA y 18 µl de la *master mix* (Mezcla RT) de PCR para adicionar un volumen final de 20 µl para cada pocillo en la placa de 96 y se procedió según indicaciones del laboratorio.

Tabla VII. Composición de la mezcla para la reacción de retrotranscripción

Componente de la mezcla RT (Retrotranscripción)	Volumen (µl) por reacción
BC3 (5X Tampón RT 3)	4
P2 (mezcla de oligo y control externo )	1
RE3 (enzima para la RT)	2
H <sub>2</sub> O libre de RNAsa	3
<b>Volumen final</b>	<b>10</b>

Como genes normalizadores (*housekeeping genes*) se utilizaron: Hsp90, Gusb (*Beta-glucuronidase*) y Hprt1 (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase*).

## 8. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE siRNA.

Para suprimir la expresión de la subunidad reguladora p85 de PI3K se utilizaron oligonucleótidos pequeños de interferencia de RNA (siRNA) prediseñados por Dharmacon (Lafayette,CO) y el procedimiento se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante y siguiendo la metodología puesta a punto en el grupo de la Dra. Isabel Fabregat (IDIBELL, Barcelona).

La tecnología de los siRNA está basada en la regulación de la expresión génica por microRNAs, que son moléculas pequeñas de doble cadena de RNA que usan las propias células para controlar la activación de los genes, es decir, suprimen la expresión de dicho gen. Así, a través de la interacción de la hebra antisentido del siRNA, incorporada al complejo *RISC* (*RNA Induced Silencing Complex*), con su secuencia complementaria en el mRNA diana, se provoca la fragmentación de dicho mRNA por *Argonaute*, componente catalítico del complejo *RISC*.

Para los experimentos se sembraron las células a una densidad de 60% de confluencia en medio DMEM 10% FBS. Al día siguiente se cambió el medio y se adicionó 0,13 ml/cm<sup>2</sup> de medio DMEM en las placas de cultivos utilizadas. Posteriormente sobre este medio se adicionó el complejo de transfección que se prepara, según las indicaciones del fabricante, de la siguiente manera (Tabla VIII):

**Tabla VIII. Mezcla de Transfección para cada siRNA**

<i>Componente</i>	<i>Volumen para el plato de cultivo</i>
MEDIO DMEM 0% FBS	25,44 µl/cm <sup>2</sup>
Transfectante	0,5 µl/cm <sup>2</sup>
siRNA * ( 20µM )	0,15 µl/cm <sup>2</sup>

\* El siRNA 5 nmol se resuspendió para su uso en agua libre de RNAsa usando solución tampón 1X ( Dharmacon).

La mezcla de transfección para ambos siRNAs, tanto SiGENOME siRNA no silenciante, que es el control (NTC), como SiGENOME SMARTpool siRNA para la subunidad P85 de PI3K (Tabla IX), se realizó en tubos separados, mezclándose cuidadosamente y dejándose reposar durante 25 minutos. Esta mezcla de transfección se adicionó lentamente y se distribuyó por todo el plato de cultivo. La concentración final de la

mezcla de transfección utilizada fue de 50nM. Posteriormente se incubó durante 8 horas a 37°C en condiciones controladas de humedad (80%) y atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%). Transcurrido ese tiempo se cambió el medio y se adicionó medio DMEM 10% FBS. Las células se utilizaron para los experimentos al día siguiente.

**Tabla IX.\* Secuencias de los siRNA empleados**

<i>Reactivos de Dharmacon siRNA</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Casa comercial</i>
SiGENOME	ACGCGAAGGCAACGAGAAA	Dharmacon
SMARTpool	UAAUAAACCACUACCGGAA	(Lafayette,CO). (D-
siRNA para	GAAGUCAAGCAUUGCGUCA	0411079-13, 14, 15
subunidad P85 de	CUAAAAUGCACGGCGAUUA	y 16)
PI3K (5 nmol)		
NM_001024955		

## 9. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOT*.

Para la **obtención de proteínas** y tras los diferentes tratamientos, se lavaron las células con PBS 1X y se despegaron del plato de cultivo por rascado. Después, se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm y 4°C. El precipitado que contenía las células se resuspendió en tampón de lisis (Tabla X) y se agitó vigorosamente mediante vórtex para facilitar la lisis, dejando actuar el tampón durante 30 minutos a 4°C, repitiendo la agitación cada cinco minutos para facilitar la lisis. Transcurrido dicho tiempo, se volvieron a agitar los lisados y se centrifugaron 10 minutos a 13000 rpm para eliminar los restos de membrana. El sobrenadante contenía el extracto de proteínas totales, que se guardó a -80°C hasta su uso.

**Tabla X. Tampón de lisis**

Deoxicolato sódico	1%
EDTA	2 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1%
SDS	0,10%
Tris-HCl pH=7.4	10 mM
Aprotinina	1%
DTT	0,5 mM
Leupeptina	5 µg/ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	0,1 mM
NaF	0,5 mM
PMSF	1 mM

- 
- Adición extemporánea
- 

La **cuantificación de proteínas** se realizó siguiendo el método espectrofotométrico descrito por Bradford (1976). Se midió la absorbancia a 590 nm, obteniendo la concentración de proteínas a partir de una curva patrón realizada previamente con BSA.

La **separación de proteínas por peso molecular se realizó mediante electroforesis** en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las muestras proteicas se prepararon en tampón de carga Laemmli y se desnaturalizaron por calentamiento, a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida según el método descrito por (Sambroock et al. 1989) en presencia de un tampón de electroforesis (Tris 25 mM; SDS 0,1%; glicina 0,2 M; a pH 8.3) a un voltaje constante. Las proteínas se separan a lo largo del gel según su peso molecular.

Una vez terminada la electroforesis, **las proteínas** cargadas negativamente (debido a la presencia de SDS) **se transfirieron** a una membrana de PVDF mediante el paso de corriente eléctrica, utilizando uno de los dos métodos siguientes:

- En un equipo de transferencia semi-seco, usando como tampón de transferencia: Tris 48 mM; SDS 0,04%; glicina 39 mM; metanol 20%; a pH 8,3; durante 0,5-1 horas a 10-15V.

- En un equipo de transferencia en húmedo, usando como tampón de transferencia: Tris-HCl 66 mM, glicina 386 mM, SDS 0,1%; durante 2 horas a 100V. Este método se seleccionó especialmente cuando se quería garantizar la transferencia de proteínas de elevado peso molecular (mayor de 100 kDa).

Para la **inmunodetección de las proteínas mediante *Western blot***, las membranas en las cuales se habían transferido las proteínas, se incubaron en una solución de bloqueo, TTBS (Tris/HCl 10 mM; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05%; a pH 7,5) suplementado con 5% de leche desnatada en polvo. Posteriormente, se incubaron en presencia de los anticuerpos primarios en TTBS suplementado con 0,5% de leche a las diluciones indicadas en la tabla XI, durante el tiempo y a la temperatura necesarios, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Transcurrida esta incubación, la membrana se lavó en TTBS con el fin de eliminar el anticuerpo no unido a proteína, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa (Amersham) en la misma solución que el anticuerpo primario, durante 1h a temperatura ambiente.

Posteriormente, la membrana se lavó de nuevo en TTBS y finalmente el revelado de la inmunodetección se hizo mediante una reacción de quimioluminiscencia utilizando el kit ECL comercializado por Amersham. Las membranas podían borrarse con objeto de ser rehibridadas con otros anticuerpos. Para ello se incubaban durante 30 minutos a 50°C en solución de borrado (Tris 62,5 mM, pH 6,8; SDS 0,5%;  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM) y se lavaban abundantemente en TTBS.



**Tabla XI. Anticuerpos para la inmunodetección de proteínas.**

ANTICUERPO	DILUCIÓN/CONCENTRACIÓN	ESPECIE	CASA COMERCIAL
$\beta$ -Actina	1: 5000 (WB)	Ratón	Sigma A5441
Antifosfotirosinas	1 $\mu$ g/ $\mu$ l (IP)	Ratón	Upstate (clon 4G10)
B-Cop	1:400 (IF)	Ratón	Novus Biologicals 120-2899
E-Cadherina	1:1000 (WB)	Ratón	BD 610181
GM130	1:200 (IF)	Ratón	BD 610823
P85-PI3K	1:2000(WB)	Conejo	Millipore 06-195
Ocludina	1:500 (WB)	Conejo	Invitrogen 71-1500
ZO-1	1:1000 (WB) 1:200 (IP)	Conejo	Invitrogen 61-7300

**WB:** *Western blot*

**IF:** Inmunofluorescencia

**IP:** Inmunoprecipitación

## 10. ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN.

Esta técnica tiene como finalidad la separación de una proteína específica por precipitación, mediante la utilización de un anticuerpo, a partir de un extracto de proteínas totales. La **inmunoprecipitación** se llevó a cabo a partir de 500-1000 mg de extracto proteico total.

Las células se lisaron en tampón RIPA (NaCl 150mM, Tris-HCl 20mM pH 7,5, Nonidet P-40 1%, ácido deoxicólico 0,5%, y SDS 0,1%), en presencia de un *cocktail* de inhibidores de proteasas, durante 90min a 4°C con agitación permanente. El solubilizado celular se clarificó por centrifugación durante 10min. a 13.000rpm. y posteriormente se realizó la inmunoprecipitación de las muestras, para ello se le añadió 4  $\mu$ g del anticuerpo anti-fosfo-tirosina (clon 4G10, Upstate), permitiendo así la formación de complejos antígeno-anticuerpo mediante incubación a 4°C durante 4 h. A continuación, se añadieron 30  $\mu$ l de proteínas A unidas a agarosa (A6531, Sigma al 50%) y se dejó en rotación durante toda la

noche. Pasado este tiempo, se realizaron cuatro lavados con el tampón de lisis, usando en cada lavado 800µl para resuspender las esferas, dando a continuación un golpe de centrifuga para volver a precipitarlas y eliminando el liquido por aspiración. Las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 8%, para lo cual se añadió tampón de carga Laemmli 2X a las muestras y se calentaron a 95-100°C durante 5 min. La fosforilación del sustrato ZO-1 se visualizó mediante *Western blot* usando un anticuerpo específico para dicha proteína. Se usó un control negativo, en el cual se añadió solo proteína A o inmunoglobulina G-agarosa para determinar posibles uniones inespecíficas a las mismas.

## 11. ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE PROTEÍNAS: ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.

Para realizar el análisis de la expresión y localización de proteínas se utilizó **microscopía de fluorescencia convencional** (laboratorio de la Dra. Isabel Fabregat, IDIBELL) y **microscopía de fluorescencia confocal** (UCM). Las células se cultivaron en cubres circulares de vidrio estériles situados dentro de una placa de 24 pocillos, cubiertos previamente con gelatina al 2% en PBS 1X durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras los tratamientos, se lavaron dos veces con tampón PBS 1X frío y posteriormente se adicionó a cada cristal 100 µl de anticuerpo primario diluido en PBS 1X suplementado con 0.1% BSA. El procesamiento de cada tinción se indica a continuación:

Para visualizar los **filamentos de actina**, las células se fijaron con 4% p-Formaldehído en PBS 1X durante 20 min a temperatura ambiente, sin realizar permeabilización con metanol debido a su efecto desestabilizador sobre los filamentos de actina. Seguidamente, se incubaron durante 1 hora a 37°C en oscuridad y atmósfera de humedad con faloidina (una toxina que se une a los filamentos de F-actina) (SIGMA), conjugada con isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), diluida 1:500 en PBS 1X suplementado con 0.1% BSA. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS 1X atemperado y se realizó el montaje en portaobjetos (Ver abajo).

Para el marcaje de la proteína **E-cadherina** se realizó una fijación con metanol puro a -20°C durante dos minutos, se lavaron las células con PBS1X frío y posteriormente bloqueamos con 2% de BSA en PBS 1X durante 10 minutos a temperatura ambiente, procediéndose a la incubación con el anticuerpo primario durante 2h a temperatura ambiente. Para visualizar las proteínas **B-COP, GM130, ZO-1** las células se fijaron con 4% p-Formaldehído en PBS 1X durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con PBS 1X y se permeabilizaron con una solución que contenía 0,1% TX-100 y 0.1% BSA

en PBS 1X durante 20 minutos. Se lavaron con PBS 1X y seguidamente se incubaron las preparaciones durante una hora con una solución de bloqueo (2% BSA en PBS 1X). A continuación se incubó durante dos horas a 37°C en presencia de un anticuerpo primario específico (ver Tabla X). Tras varios lavados en PBS 1X, las células se incubaron en presencia de un anticuerpo secundario a una dilución 1:200 acoplado al fluorocromo Alexa-fluor 488, o Alexa-fluor 594, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. De nuevo, el exceso de anticuerpo se eliminó mediante lavados con PBS 1X.

Para las **dobles inmunocitoquímicas** de ZO-1 y GM130, se incubaron las células con una mezcla de anticuerpos primarios a la misma concentración que las tinciones individuales, durante 2 horas. Después de los lavados con PBS 1X, se incubaron con una mezcla de anticuerpos secundarios acoplados a un fluorocromo Alexa-fluor 488 y Alexa fluor 594 respectivamente, a una dilución 1:200 durante 1 hora, a temperatura ambiente.

Las preparaciones se **montaron** en portaobjetos embebidas en medio de montaje comercial (Vectashield, Vector Laboratories) que preserva la fluorescencia de las preparaciones y que además lleva Hoechst 3342 o DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) incorporado, que permite la visualización de los núcleos celulares. Para la inmunocitoquímica de B-COP se incubó junto con el anticuerpo secundario el DAPI a una dilución 1:1000 en PBS 1X (Molecular Probes). Las preparaciones se **visualizaron** finalmente en un microscopio láser confocal Leica (DMIRE-2) acoplado a sistema láser confocal espectral TCS SP2 con AOBS, del CAI Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid, o microscopio de fluorescencia Olympus BX-60 del Instituto IDIBELL-Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge.

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se han expresado como la media aritmética de valores de entre 4 – 10 experimentos independientes y su error estándar de la media ( $\pm$ S.E.M.). Para determinar el grado de significación estadística de la diferencia de dos medias, se ha utilizado la t-Student o U de Mann-Whitney según los datos se acoplasen a una distribución normal o no. Para el estudio de normalidad de los datos se empleó el test Shapiro-Wilk utilizando el programa GraphPad Prism 5. Se consideran diferencias estadísticamente significativas entre las variables a partir de un valor de  $p < 0,05$ . En las gráficas se indica la significación estadística de la siguiente manera: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$  y \*:  $p < 0,05$ .

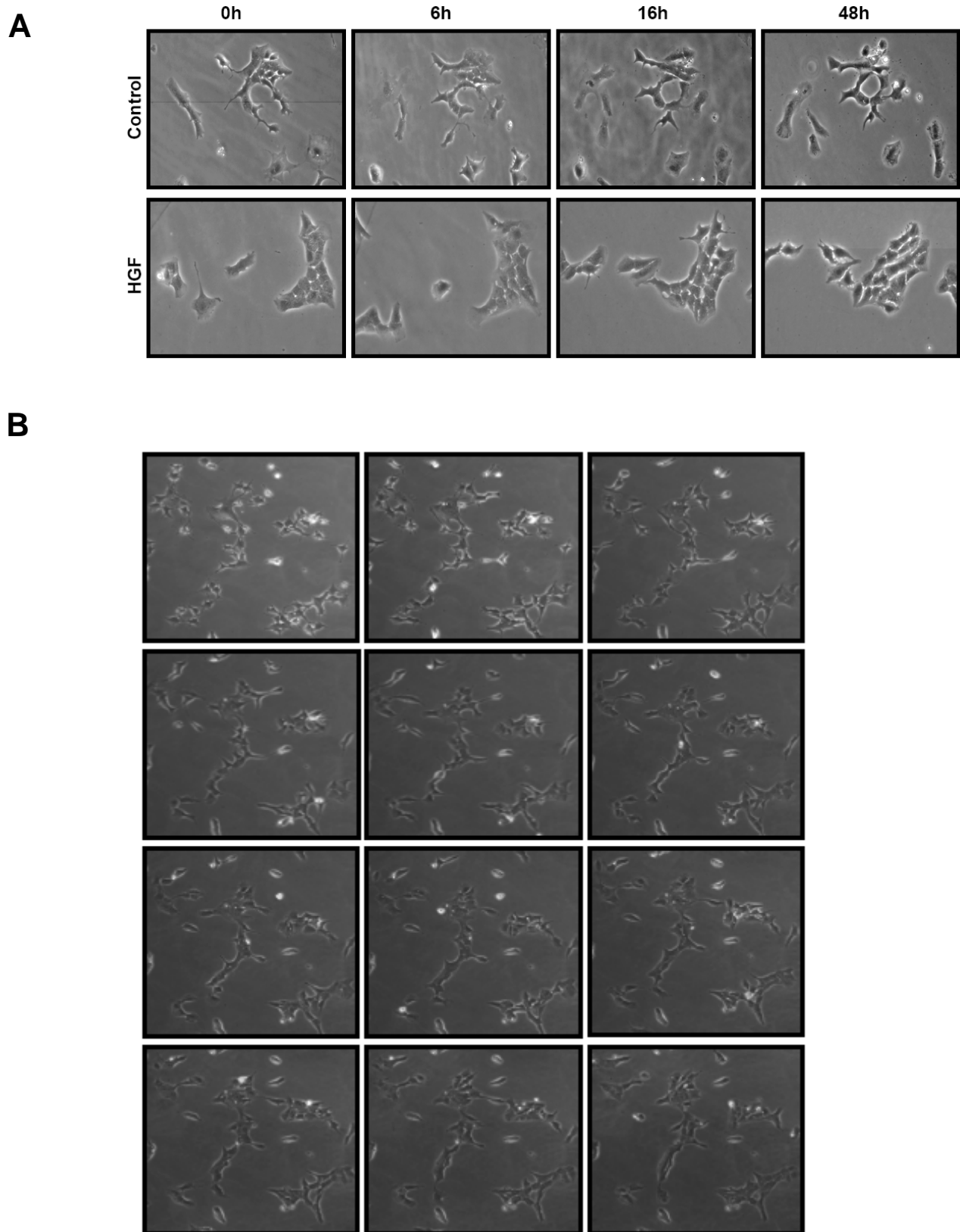
## **IV. RESULTADOS**



## 1. EL HGF PROMUEVE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN EN CÉLULAS OVALES CON UN RECEPTOR c-MET FUNCIONAL (MET<sup>flx/flx</sup>).

### 1.1. El HGF no induce dispersión, pero promueve la migración y reorganización de células ovas *in vitro*.

Como se mencionaba en la introducción, uno de los efectos bien conocidos del HGF es el de promover la dispersión (*scattering*) de células epiteliales, de ahí que al HGF también se le conozca como *Scatter Factor* (Stoker et al. 1987; Gherardi et al. 1989). Así, para caracterizar el papel de HGF en la migración de las células ovas, en primer lugar analizamos si el HGF era capaz de inducir este efecto, usando para ello células Met<sup>flx/flx</sup>, que han demostrado responder muy bien al HGF (del Castillo et al. 2008). Para ello se realizaron “ensayos de dispersión”, en los que las células se siembran a una densidad muy baja, de forma que puedan crecer formando pequeñas colonias o grupos de células separados entre sí. Al día siguiente, se seleccionaron de forma aleatoria algunas áreas del plato de cultivo en las que se visualizaban claros agrupamientos de células. Posteriormente, se estimularon las células con HGF (40ng/ml), y se hizo un seguimiento de la morfología a distintos periodos de tiempo a lo largo del cultivo, tomándose fotografías a los distintos tiempos. Como se aprecia en la *figura 22 A*, se observan células aisladas con fenotipo migratorio en el cultivo, tanto en células sin tratar como en células tratadas con HGF. Sin embargo, es evidente que no hay dispersión de las células que forman parte de una colonia, ni en ausencia ni en presencia de HGF. No obstante, las células tratadas con HGF sufren cambios morfológicos muy específicos. Así, el HGF promueve un fenómeno migratorio atípico dirigido al agrupamiento en lugar de la disociación y dispersión de las células integrantes de una colonia celular. En una primera fase, se observa que las células migratorias tienden a unirse a otras células vecinas formando colonias más grandes, y en una segunda fase, se observa un proceso de reorganización celular en forma de hileras dentro de la colonia, de forma que tras 24-48 horas de tratamiento, las células presentan una distribución organizada en filas o hileras, fenómeno que parece emular la organización de los hepatocitos en hileras en el parénquima hepático *in vivo*. Esta reorganización celular no es evidente en células control, sin tratamiento, donde además se puede ver pérdida celular moderada, algo esperado ya que resultados previos del grupo han demostrado que las células ovas son ligeramente sensibles a la apoptosis inducida por privación de suero (del Castillo et al. 2008). En cuanto a las células deficientes de c-Met (células Met<sup>-/-</sup>), no se observaron signos de reorganización y polarización celular, ni en ausencia ni en presencia de HGF (resultados no mostrados), demostrando que este efecto es específicamente inducido por HGF y que requiere una señalización intacta a través de Met. En la *figura 22B* se muestran imágenes



**Figura 22. Efecto del HGF sobre la migración *in vitro* de células ovas. Ensayos de dispersión celular (*scatter*).** Células ovas  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  fueron cultivadas en placas de plástico en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml). **A.** Morfología del cultivo por microscopía de contraste de fases. Se muestran imágenes de un campo representativo de cada condición a distintos tiempos. **B.** Video-microscopía de las células ovas  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$ . Las células se filmaron a intervalos de 20 minutos durante 48 horas para observar la migración y organización celular. Se muestran 12 instantáneas de las imágenes que componen el video.

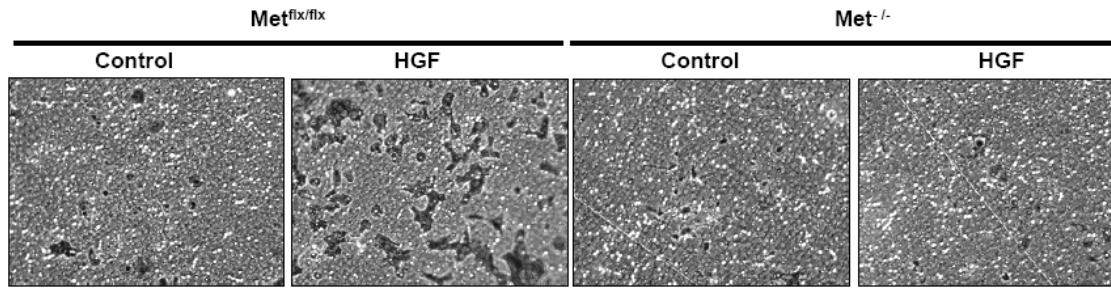
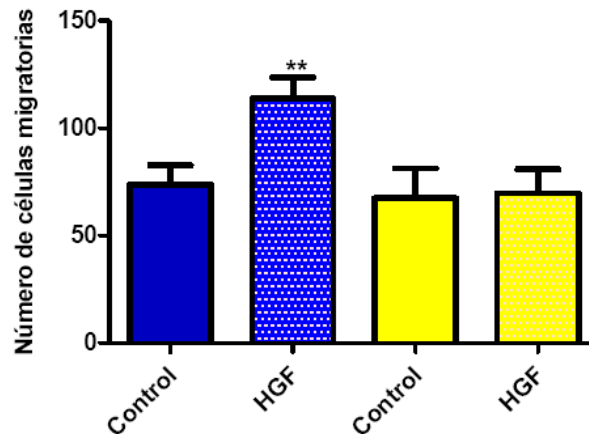
secuenciales de un video grabado por microscopía, de células ovals  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  incubadas en presencia de HGF (40ng/ml), en las que se observa el mismo fenómeno descrito anteriormente.

Estos resultados constituyen las primeras evidencias de que el HGF induce una respuesta motogénica diferencial y específica en células ovals, que parece diferir notablemente de lo descrito previamente en otros sistemas de células epiteliales [revisado por (Stella and Comoglio 1999)].

## **1.2. EL HGF promueve la migración e invasión *in vitro* de células ovals $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$ a través de matriz extracelular.**

Para profundizar en el estudio del efecto de HGF sobre la migración e invasión de las células ovals, a continuación decidimos analizar la capacidad de las células ovals de atravesar proteínas de matriz extracelular, y cómo la activación de la vía de señalización de HGF/c-Met afectaba a las mismas. Para ello, sembramos las células  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  y  $\text{Met}^{-/-}$  en cámaras *transwells* previamente cubiertas con una proteína de membrana basal, concretamente colágeno IV, o bien con una matriz extracelular reconstituida, conocida como matrigel, y se mantuvieron en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml) durante 24h. Como se muestra en la *figura 23 A y B*, tanto las células ovals  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  como las  $\text{Met}^{-/-}$  en condiciones basales, es decir, en ausencia de estímulos exógenos, tienen baja capacidad intrínseca para atravesar *transwells* cubiertos con colágeno IV y no existen diferencias significativas entre los dos tipos celulares ( $P < 0.0848$ ). Sin embargo, en presencia de HGF, el número de células ovals  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  capaces de atravesar la membrana cubierta con colágeno IV aumenta significativamente ( $P = 0.0041$ ), efecto que no se observa en células ovals  $\text{Met}^{-/-}$  ( $P = 0.6328$ ), demostrando una vez más la especificidad del efecto y la necesidad de una actividad tirosina quinasa intacta de Met para mediar los efectos migratorios inducidos por el HGF.

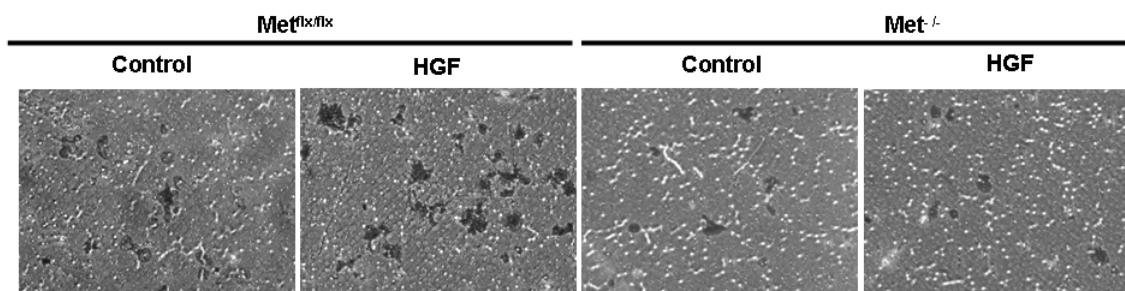


**A****B**

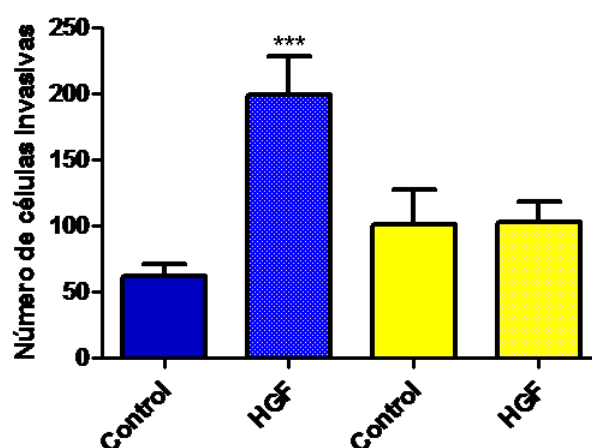
**Figura 23. Efecto del HGF sobre la migración/invasión *in vitro* de células ovasales a través de cámaras *transwell* cubiertas con colágeno IV.** Células ovasales  $Met^{flx/flx}$  y  $Met^{-/-}$  fueron sembradas en la cámara superior sobre filtros previamente cubiertos con colágeno IV e incubadas durante 24h en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml). **A.** Imágenes de microscopía de contraste de fase de campos representativos de la cara inferior de los filtros correspondientes a las células que han atravesado la membrana tras 24h de tratamiento, fijadas y teñidas con cristal violeta. **B.** Análisis cuantitativo del número total de células que migran a través de la membrana cubierta con colágeno IV. Los valores representan la media±SEM de al menos 5 experimentos realizados por duplicado. \* $P<0,05$  respecto al control. Serie de barras a la izquierda: células  $Met^{flx/flx}$ . Serie de barras a la derecha: células  $Met^{-/-}$ .

Resultados similares se obtuvieron cuando las células se cultivaron sobre filtros cubiertos con matrigel. En presencia de HGF, el número de células ovasales  $Met^{flx/flx}$  capaces de invadir el matrigel aumenta significativamente, entre 3 y 10 veces aproximadamente ( $P=0.0001$ ), efecto que no se observa en células ovasales  $Met^{-/-}$  (Figura 24 A y B).

A



B



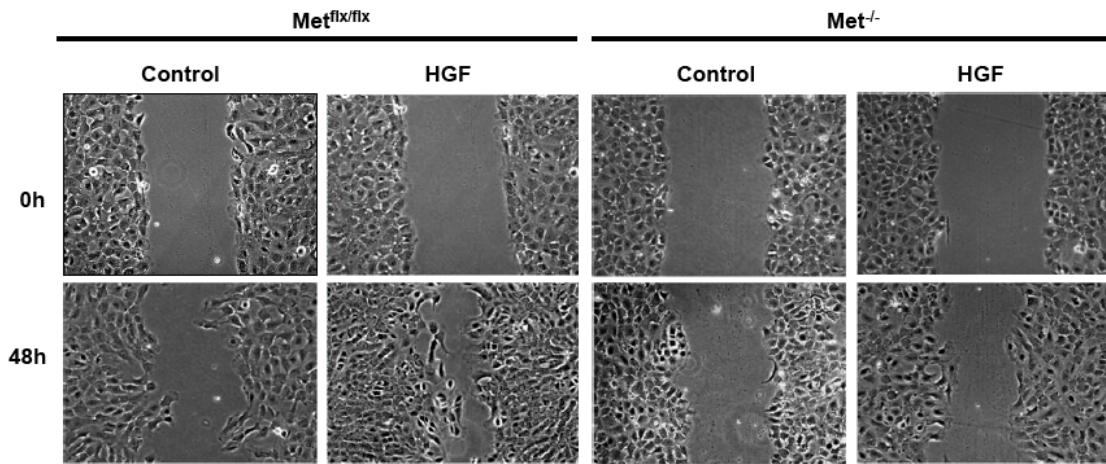
**Figura 24. Efecto del HGF sobre la migración/invasión *in vitro* de células ovals a través de cámaras *transwell* cubiertas con matrigel.** Células ovals  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  y  $\text{Met}^{-/-}$  fueron sembradas en la cámara superior sobre filtros previamente cubiertos con matrigel e incubadas durante 24h en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml). **A.** Imágenes de microscopía de contraste de fase de campos representativos de la cara inferior de los filtros tras 24h de tratamiento, tras la fijación y tinción de las células con cristal violeta. **B.** Gráfica cuantitativa del número total de células que invaden la matriz en cada condición en un tiempo de 24h. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de al menos 5 experimentos realizados por duplicado. \*\*\* $P < 0,001$  respecto al control. Serie de barras a la izquierda: células  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$ . Serie de barras a la derecha: células  $\text{Met}^{-/-}$ .

### 1.3. El HGF favorece el proceso migratorio dirigido al cierre de herida en células ovals.

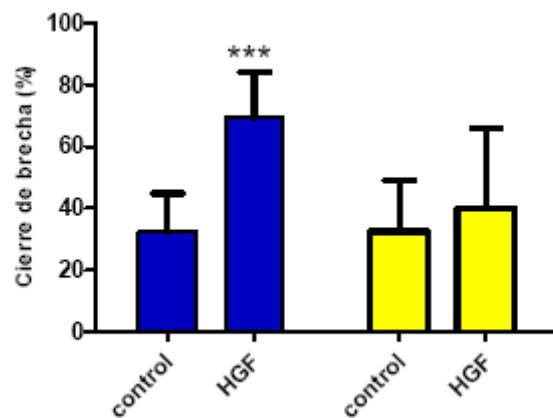
Como último abordaje experimental para estudiar el efecto del HGF en la migración de las células ovals, utilizamos un modelo clásico de cierre de herida *in vitro*. Estos ensayos además de permitir analizar la capacidad migratoria de las células, constituyen un modelo *in vitro* que simula el proceso de cicatrización que tiene lugar *in vivo* en respuesta a un daño tisular. Para llevar a cabo este experimento se utilizaron células  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  y  $\text{Met}^{-/-}$  sembradas a densidad cercana a confluencia en placas de plástico. Al día siguiente, se realizó una “brecha” o “herida” con una punta de pipeta estéril, y se monitorizó la migración celular hacia la herida, en presencia o ausencia de HGF (40ng/ml) durante 48 horas. Como se puede observar en la *figura 25 A y B*, las células ovals  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  muestran una ligera capacidad intrínseca para cerrar la herida, pero esta capacidad se ve significativamente ( $P=0.0001$ ) incrementada en presencia de HGF, pasando de una reducción de la superficie de la herida de aproximadamente un 20-25%, a

una reducción de 60%-65%, en células sin tratar y tratadas, respectivamente. En las células Met<sup>-/-</sup>, sin embargo no se observan diferencias significativas (P=0.4764) en presencia o ausencia de HGF.

**A**



**B**



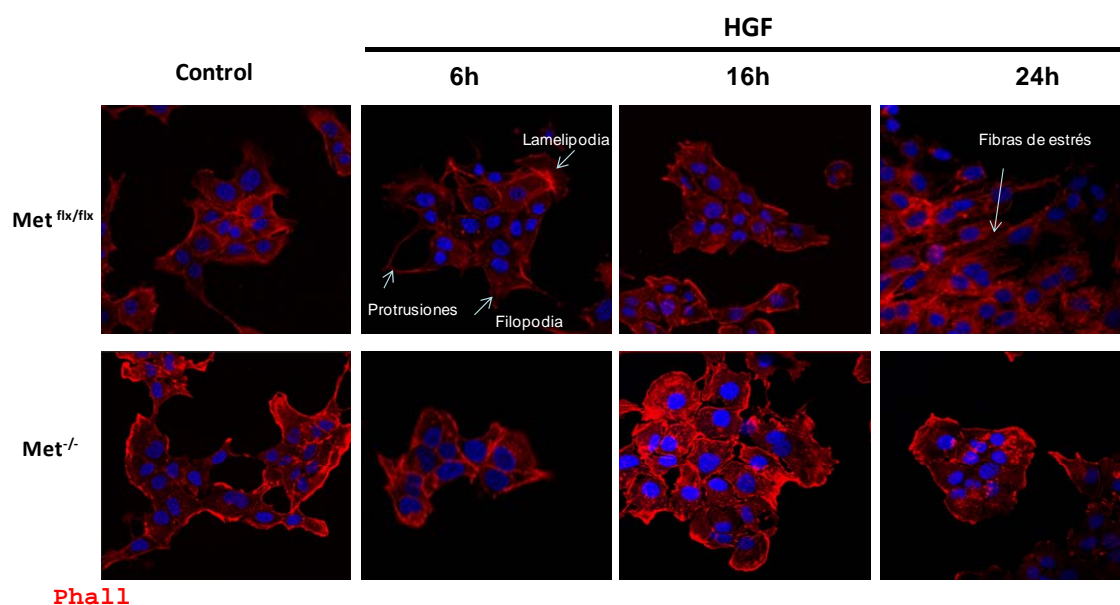
**Figura 25. Efecto del HGF sobre la migración *in vitro* de células ovas. Ensayos de cierre de brecha.** Células ovas Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup> fueron sembradas a confluencia en placas de plástico de área 11.78cm<sup>2</sup>. Al día siguiente se realizó la herida y se cultivaron durante 48h en medio sin suero en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml). **A.** Imágenes de microscopía de contraste de fases de los cultivos a 0h (tras realizar la herida) y a 48h de tratamiento. Cada imagen es representativa de al menos 12 campos seleccionados aleatoriamente de 4 experimentos independientes. **B.** Gráfica cuantitativa que representa el porcentaje del cierre de herida a las 48h, teniendo en cuenta el área de la brecha inicial y después de 48h, medido mediante el programa *ImageJ*. Los datos representan la media±S.E.M. de cuatro experimentos independientes. \*\*\*P<0.001 respecto al control. Barras a la izquierda: células Met<sup>flx/flx</sup>. Barras a la derecha: células Met<sup>-/-</sup>.

En resumen, todo este conjunto de resultados pone de manifiesto que el HGF no actúa en las células ovas como un factor de dispersión, pero promueve la migración celular e invasión de estas células a través de proteínas de la matriz extracelular, así como la migración dirigida al cierre de herida.

## 2. CARACTERIZACIÓN CELULAR Y MOLECULAR DEL EFECTO MOTOGÉNICO Y PRO-INVASIVO INDUCIDO POR HGF EN CÉLULAS OVALES.

### 2.1. El HGF favorece la reorganización del citoesqueleto de actina.

Para continuar con el estudio del fenotipo migratorio inducido por HGF, a continuación analizamos la organización del citoesqueleto de actina, ya que ésta sufre un proceso de reordenamiento durante los procesos de migración celular. Para ello, visualizamos la actina mediante microscopía confocal tras la tinción con faloidina conjugada con rodamina. Como se observa en la *figura 26*, las células ovals en ausencia de tratamiento (0h) presentan un fenotipo mixto, con células que presentan la actina concentrada en la periferia celular en forma de anillo y en las zonas de contacto célula-célula, y otras en las que los filamentos están desorganizados. No obstante, en las células  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  tras el tratamiento con HGF se observa una desorganización muy generalizada de los filamentos de actina, principalmente en las células situadas en los bordes de la colonia celular. A las pocas horas de tratamiento, un gran número de células han perdido la actina de las zonas de contacto intercelulares, observándose la formación de numerosas estructuras ricas en actina en los frentes migratorios de la colonia de células, de tipo filopodia y lamelipodia, así como ondulaciones de la membrana celular (*ruffles*), todas ellas estructuras típicas de células en migración. A tiempos más tardíos (16h y 24h), se sigue observando este fenotipo migratorio, con formación de fibras de estrés en las colonias de células, lo que se ajustaría perfectamente con un proceso de movimiento y reorganización celular.

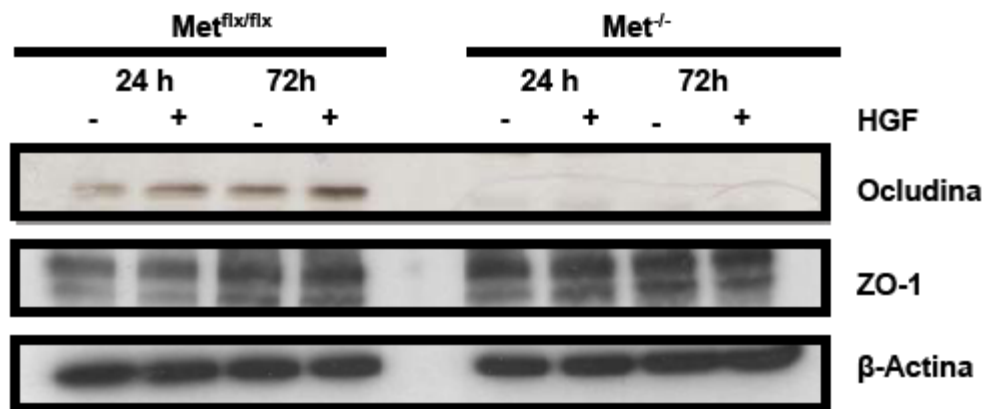


**Figura 26.** Análisis del efecto del HGF sobre el citoesqueleto de actina en células ovals *in vitro*. Las

células ovals fueron incubadas con HGF (40ng/ml) durante los tiempos indicados. Posteriormente, fueron fijadas y teñidas con faloidina conjugada con rodamina para su análisis por microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas de un total de 4 experimentos realizados.

## 2.2. El HGF altera las uniones célula-célula.

Seguidamente evaluamos si el proceso de migración inducido por el HGF estaba asociado a cambios en los niveles de expresión y/o localización subcelular de proteínas de las uniones célula-célula, concretamente, analizamos proteínas de las uniones estrechas, como ZO-1 y ocludina. Los niveles de la proteína ZO-1 no se modulan en respuesta a HGF, ni en las células ovals  $Met^{flx/flx}$  ni en las  $Met^{-/-}$ . En cuanto a los niveles de ocludina, cabe destacar que sólo se detecta expresión de la proteína en células ovals  $Met^{flx/flx}$ , pero no en las células  $Met^{-/-}$ , fenómeno cuya explicación está por determinar. En células  $Met^{flx/flx}$ , los niveles de ocludina se mantienen o incluso aumentan ligeramente en presencia de HGF. Estos resultados indican que el fenómeno migratorio inducido por HGF no está acompañado de la pérdida de expresión de proteínas de las uniones estrechas (figura 27). No obstante, quisimos analizar si había algún



**Figura 27. Análisis por western blot del efecto del HGF sobre la expresión de proteínas de las uniones estrechas en células ovals.** Las células fueron sembradas en placas de 21.29 cm<sup>2</sup> a una densidad del 60%, y se mantuvieron con o sin HGF (40ng/ml) en medio DMEM sin suero durante los tiempos indicados. Se recogieron extractos de proteína total para el posterior análisis por western blot, según se indica en materiales y métodos. Se usó β-actina como control de carga.

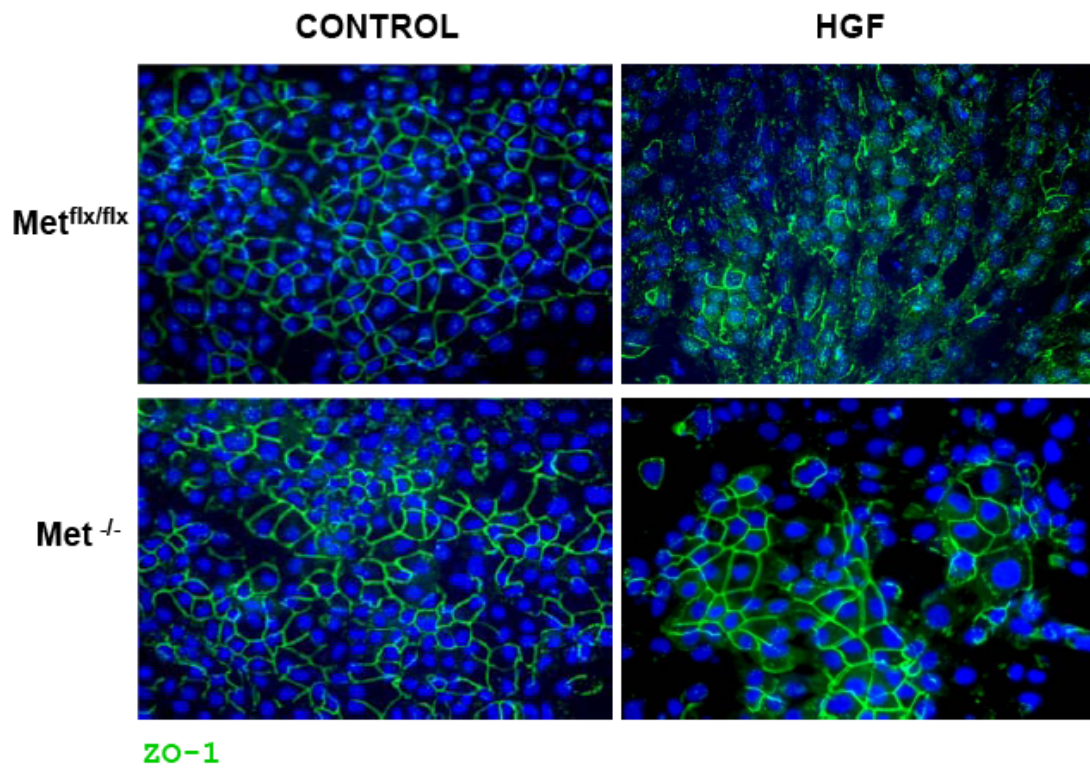
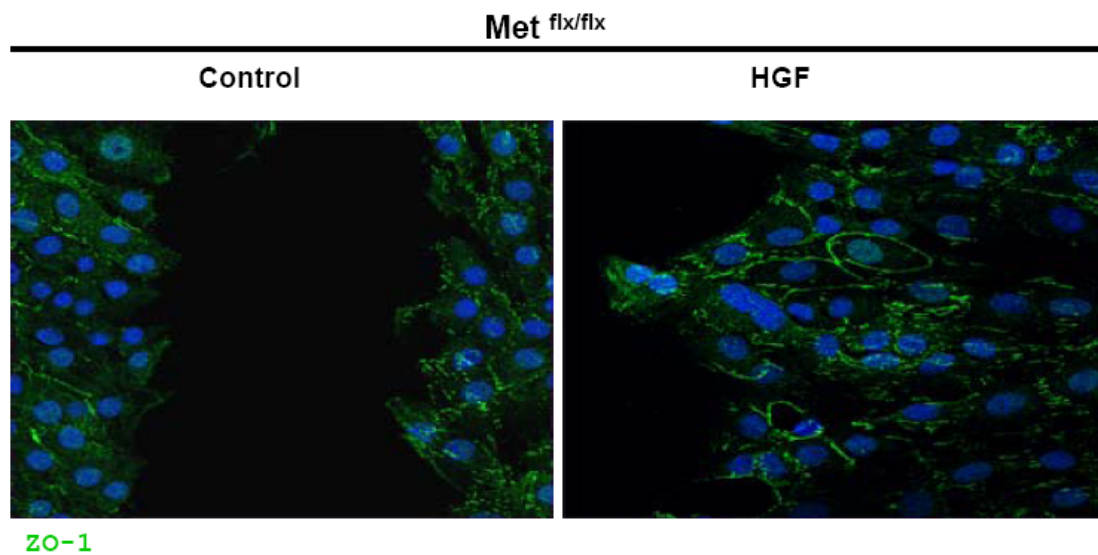
cambio a nivel de la localización subcelular de ZO-1, estudio que se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Isabel Fabregat en el IDIBELL. Para ello, las células ovals fueron cultivadas a una densidad del 60% y después de 24h de tratamiento con HGF (40ng/ml) fueron fijadas y tratadas como se describe en materiales y métodos,

analizándose tanto por microscopía de fluorescencia convencional, como por microscopía de fluorescencia confocal. Ambos abordajes dieron resultados análogos. Como se puede observar en la *figura 28A*, la reorganización celular inducida por HGF en las células ovas Met<sup>flx/flx</sup> está asociada con una relocalización de ZO-1 hacia el citoplasma de la célula. Así, se observa una pérdida de expresión en la membrana celular, en las zonas de contacto intercelular, y la aparición de un patrón de expresión más difuso, en el interior celular. Este fenómeno no se observa en las células Met<sup>-/-</sup>, lo que indica una vez más, que se requiere la actividad tirosina quinasa de Met para la inducción del mismo. Nuestros resultados por tanto, indican que la migración inducida por HGF en células ovas está asociada con el desensamblaje de las uniones estrechas. La relocalización de la proteína ZO-1 al interior del citoplasma ha sido descrita previamente por otros autores en distintos tipos celulares, como células epiteliales gástricas, aunque a diferencia de lo que ocurre en las células ovas, en estos casos dicho efecto es concomitante a la inducción de la dispersión celular (Hollande et al. 2001).

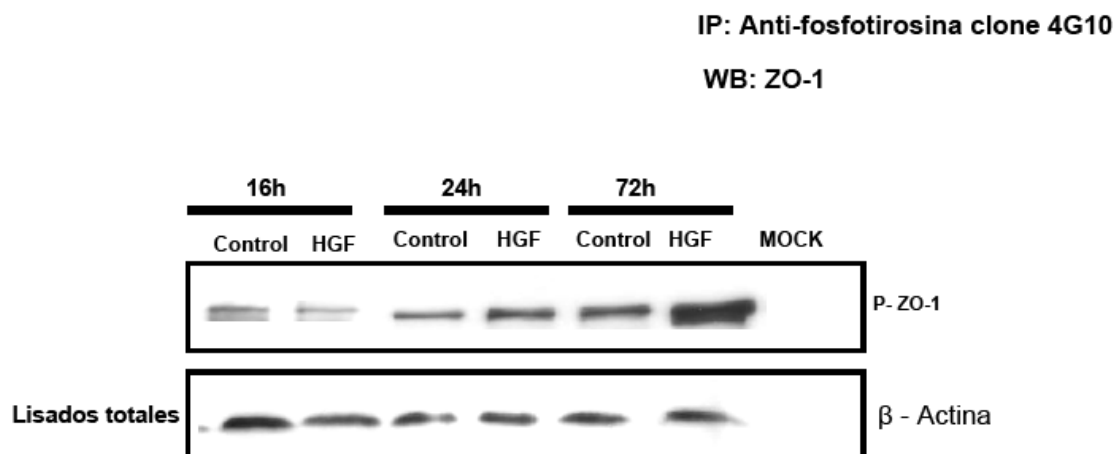
Para complementar los resultados obtenidos en células en cultivo normal, se analizó la localización de ZO-1 en el modelo de cierre de herida, en el que se promueve la migración dirigida de las células. Nuestros resultados muestran (*figura 28 B*) que la migración celular hacia la brecha está asociada a una relocalización del ZO-1 hacia el citoplasma, principalmente en el borde de la herida. Aunque en la situación control también se observa cierto grado de relocalización de ZO-1, lo que parece lógico dado que hay un proceso de reorganización celular posterior al daño (brecha), el fenómeno es más acusado en presencia de HGF, en consistencia con el resultado previamente descrito de un efecto pro-cicatrizante del HGF.

A continuación, quisimos comprobar si la relocalización de ZO-1 inducida por HGF estaba relacionada con la activación por fosforilación de la proteína, como se ha descrito previamente (Hollande et al, 2001). Las células ovas Met<sup>flx/flx</sup> fueron tratadas con HGF por varios periodos de tiempo. Posteriormente, se recogieron lisados para analizar la fosforilación de ZO-1 mediante inmunoprecipitación de proteínas fosforiladas en tirosina, usando un anticuerpo antifosfotirosina (clone 4G10), seguido de inmunodetección de ZO-1 mediante un anticuerpo específico para la proteína. Los resultados fueron positivos (*figura 29*), observándose un aumento de la fosforilación de la proteína de un modo dependiente del tiempo, alcanzando el mayor grado de fosforilación a 72h de tratamiento. Los niveles basales de fosforilación de ZO-1 podrían ser una consecuencia de la señalización autocrina del HGF en las células ovas, previamente reportada por nuestro grupo (del Castillo et al. 2008). De este modo, podemos decir que el proceso migratorio inducido por HGF en células ovas está asociado a la activación e internalización de ZO-1 hacia el citoplasma de la célula, lo que sugiere la existencia de cambios profundos en la adhesión célula-célula.



**A****B**

**Figura 28. Análisis del efecto del HGF sobre la localización subcelular de ZO-1 en células ovas *in vitro*.** Las células ovas fueron incubadas con HGF (40ng/ml) durante 24 horas. Las células se fijaron y tiñeron con un anticuerpo anti-ZO-1 y posteriormente anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor 488 (verde). Para la visualización de los núcleos se usó DAPI (azul). **A.** Imágenes de microscopía confocal correspondientes a la expresión/distribución de ZO-1 en células en cultivo normal. Se muestra un experimento representativo de 4. **B.** Imágenes de microscopía confocal correspondientes a la expresión/distribución de ZO-1 en células ovas Met<sup>flx/flx</sup> sometidas al modelo de cierre de herida *in vitro*. Se muestran imágenes representativas de un experimento de 2 realizados..



**Figura 29. Análisis de la activación de ZO-1 en células ovals en respuesta al HGF.** Detección de la forma fosforilada activa de ZO-1 en las células ovals Met<sup>flx/flx</sup>, en las condiciones indicadas, mediante inmunoprecipitación de fosfotirosinas y posterior inmunodetección de ZO-1. Como control de especificidad de los cambios observados se presenta la expresión de un gen normalizador, β-Actina, en los lisados utilizados para la inmunoprecipitación.

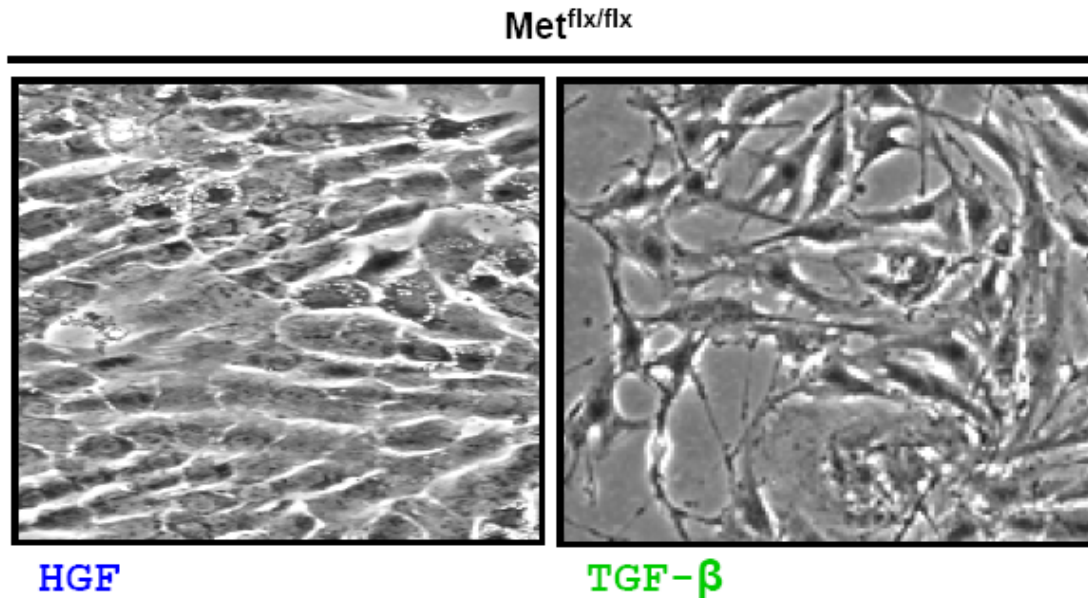
### 2.3. El fenotipo migratorio inducido por HGF no está asociado a un proceso de EMT.

#### 2.3.1 El HGF no induce la adquisición de una morfología de célula mesenquimática en células ovals.

La inducción de un fenotipo migratorio suele estar asociado a un cambio fenotípico celular, concretamente la transición de un fenotipo epitelial a mesenquimático o EMT, y así se ha descrito también para la migración inducida por HGF en varias líneas tumorales hepáticas (Grotegut et al. 2006). Como se ha comentado en la introducción, los procesos de EMT se caracterizan principalmente por la inhibición del contacto célula-célula, reorganización del citoesqueleto de actina, pérdida de la polarización celular y adquisición de un fenotipo invasivo y migratorio (Thiery. 2003; Acloque et al. 2009). En apartados previos de resultados hemos mostrado que el efecto pro-migratorio y pro-invasivo inducido por HGF en células ovals va acompañado de cambios en la organización del citoesqueleto de actina y en la localización subcelular de ZO-1, proteína de unión célula-célula. Sin embargo, también hemos mostrado que el HGF conducía a largo plazo a la agrupación celular y organización en hileras, lo que no parece evidenciar un cambio hacia un fenotipo mesenquimático. En la *figura 30* se presenta un análisis morfológico comparativo a través del microscopio, de las células ovals cultivadas en presencia de HGF o de TGF-β, un factor que induce un potente proceso de EMT en hepatocitos fetales de rata y humanos, células de carcinoma hepatocelular (Valdes et al. 2002; Caja et al. 2007), y en células ovals (resultados no publicados del grupo). Es evidente que las células



incubadas 24 horas con HGF presentan un aspecto muy diferente al de las células tratadas con TGF- $\beta$ . En contraste al aspecto típico de un cultivo de células fibroblastoides, sin adhesión intercelular, y desordenado, en presencia de TGF- $\beta$ , las células con HGF presentan una morfología mucho más organizada, típicamente epitelial, visualizándose de forma clara la formación de hileras de células.

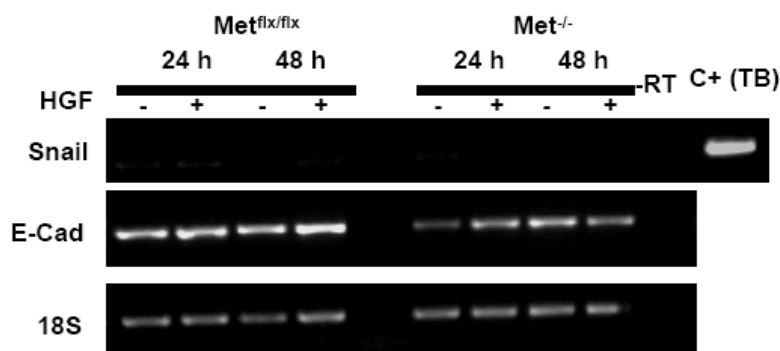


**Figura 30. Morfología de las células ovals tratadas con HGF o TGF- $\beta$ .** Imágenes representativas obtenidas por microscopía de contraste de fases de las células ovals Met<sup>flx/flx</sup> tratadas con HGF (40ng/ml) o con TGF- $\beta$  (2ng/ml) durante 24h.

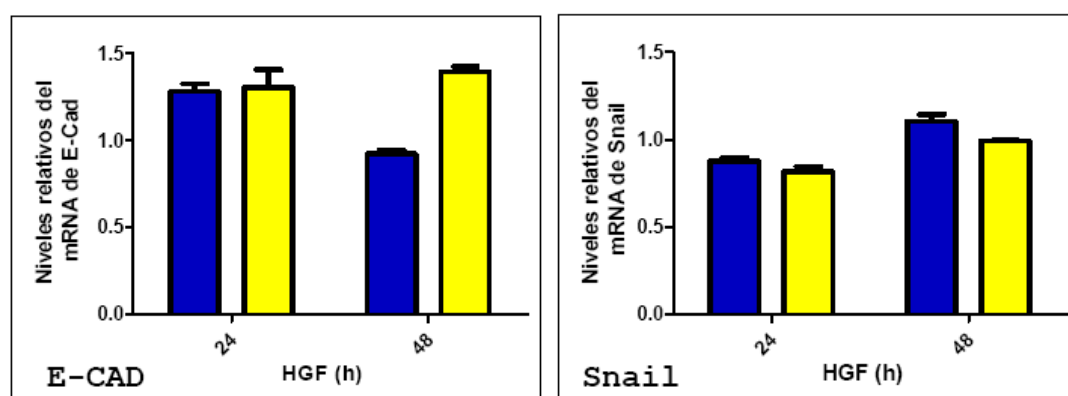
### 2.3.2 El HGF no induce la expresión de Snail ni modula los niveles de expresión de E-cadherina en células ovals.

A pesar de que morfológicamente no se evidenciaba un proceso de EMT, decidimos confirmar este hecho de una manera más clara, para lo cual analizamos la expresión de Snail, un factor de transcripción que, como se ha comentado en la introducción, se induce durante la EMT y tiene un papel crítico en la regulación de este proceso [revisado por (Cano et al. 2000) y (Nieto. 2002)] y E-cadherina, proteína que forma parte de las uniones célula-célula de tipo adherentes, característica de células epiteliales, y cuya expresión es inhibida por Snail (Cano et al. 2000). Para ello, sembramos las células a una densidad del 60% y tras 24 y 48h de estimulación con HGF, se recogió RNA y se analizó por RT-PCR. Como se muestra en la *figura 31 A*, no observamos expresión del mRNA de Snail, ni en ausencia ni en presencia de HGF. Asimismo, tampoco observamos una disminución aparente de los niveles de mRNA de E-cadherina. Los resultados fueron idénticos en células Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>. Estos resultados se corroboraron mediante análisis por qRT-PCR (*figura 31 B*). Aunque se observan ligeras fluctuaciones, en ningún caso se ven diferencias significativas entre células tratadas y no

A



B

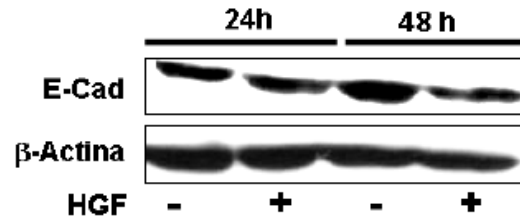


**Figura 31. Efecto del HGF sobre los niveles de mRNA de Snail y E-cadherina en células ovaes.** Las células ovaes Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup> fueron sembradas en placas de plásticos de área 21.29 cm<sup>2</sup> a una densidad del 60% y se mantuvieron con o sin HGF (40 ng/ml) durante los tiempos indicados. **A.** Análisis por RT-PCR de los niveles de mRNA de Snail y E-cadherina en las células ovaes. Se muestra el RNA ribosomal 18S como control de carga. Como control positivo para Snail se usó RNA de células ovaes tratadas durante 24h con TGF- $\beta$ . **B.** Análisis por Q-RTPCR de la expresión de Snail y E-cadherina en células incubadas durante 24 y 48 horas en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml). Barras azules (Met<sup>flx/flx</sup>). Barras amarillas (Met<sup>-/-</sup>).

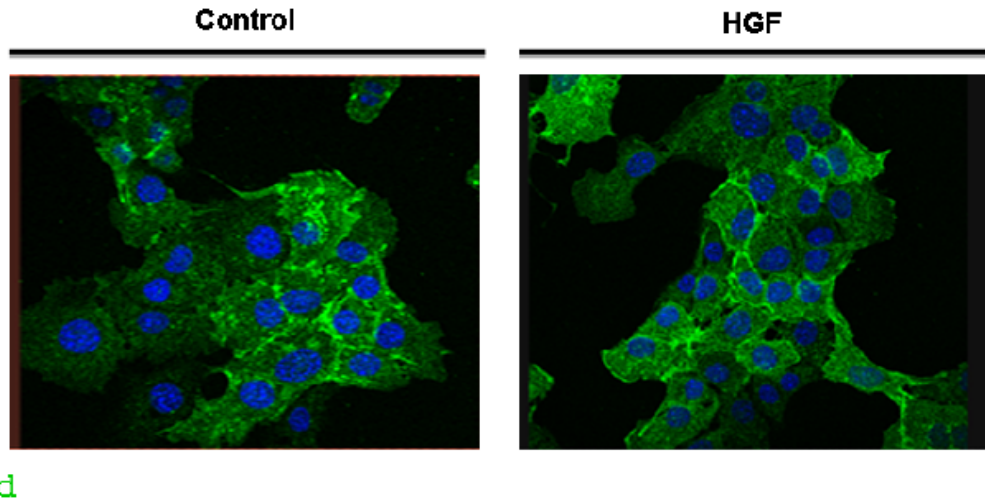
tratadas, ni en las células Met<sup>flx/flx</sup> ni en las Met<sup>-/-</sup>. Además, analizamos los niveles de proteína de E-cadherina mediante ensayos de *western blot* e inmunocitoquímica. En consonancia con los resultados de RT-PCR, no se vió modulación a nivel de expresión de proteína (*figura 32 A*). En cuanto a la localización subcelular de E-cadherina, las células ovaes presentan un patrón de tinción heterogéneo, tanto en membrana como en citoplasma, pero no observamos cambios aparentes en la localización subcelular de la proteína en las distintas condiciones (*figura 32 B*).

Estos resultados constituyen, en su conjunto, una evidencia clara de la ausencia de un proceso de EMT en células ovaes en respuesta al HGF.

A



B



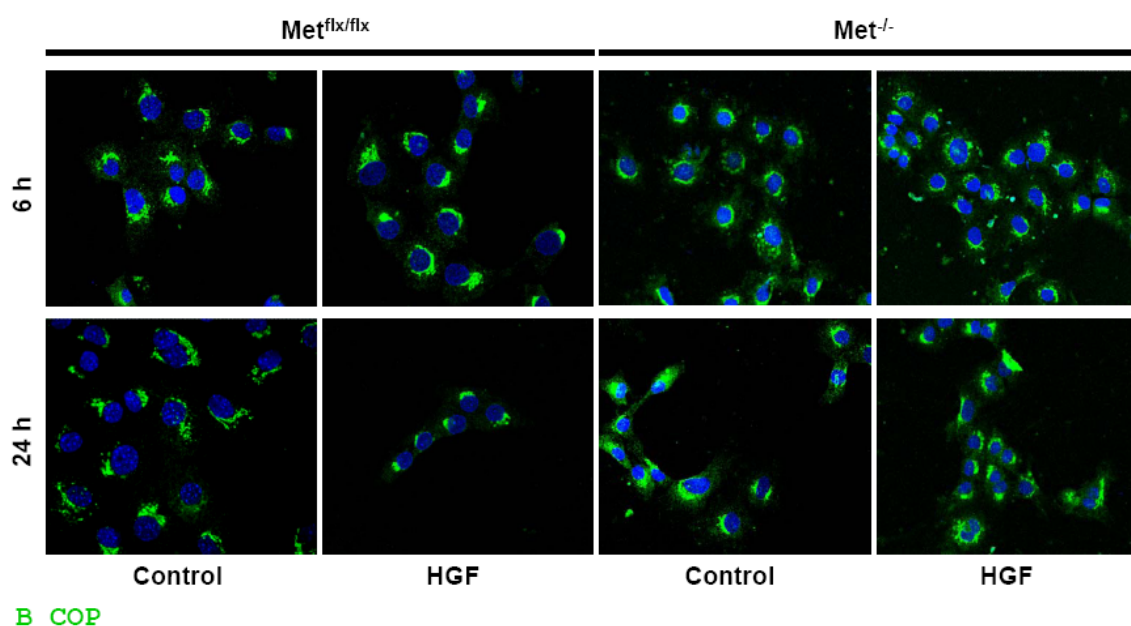
E-cad

**Figura 32. Efecto del HGF sobre la expresión y localización subcelular de la proteína E-cadherina en células ovas.** **A.** Análisis mediante *western blot* de los niveles de proteína de E-cadherina en células  $Met^{flx/flx}$ . Las células ovas fueron sembradas en placas de plásticos de área 21.29 cm<sup>2</sup> a una densidad del 60% y se mantuvieron con o sin HGF (40 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se muestra β-Actina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de tres analizados. **B.** Análisis mediante Microscopía de Fluorescencia de la expresión y localización subcelular de E-cadherina en células  $Met^{flx/flx}$ . Las células se mantuvieron en medio DMEM sin suero con o sin HGF (40ng/ml) durante 24h. E-cadherina fue detectada con un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor 488 y la tinción nuclear se realizó mediante incubación con DAPI.

#### 2.4. El HGF promueve la migración polarizada de las células ovas.

La observación del fenómeno de organización celular en presencia de HGF nos indujo a pensar que la migración celular inducida por este factor era una migración orientada/polarizada, no aleatoria. En cualquier caso, para intentar confirmar dicha hipótesis, decidimos analizar la distribución del aparato de Golgi, ya que se sabe que una de las características de la célula migratoria polarizada es presentar una reorientación del Golgi hacia la dirección de migración celular (Preisinger et al. 2004). Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Isabel Fabregat en el IDIBELL. Para ello, las células ovas fueron cultivadas en placas de plástico en las mismas condiciones descritas anteriormente para los "ensayos de dispersión". Tras 6 y 24 horas de tratamiento se fijaron y tiñeron con un anticuerpo frente a B-COP, una de las subunidades del complejo de proteínas de la cubierta de las vesículas de transporte a través del Golgi (Stenbeck et al. 1993), o un anticuerpo frente a GM130, una proteína de matriz cis-

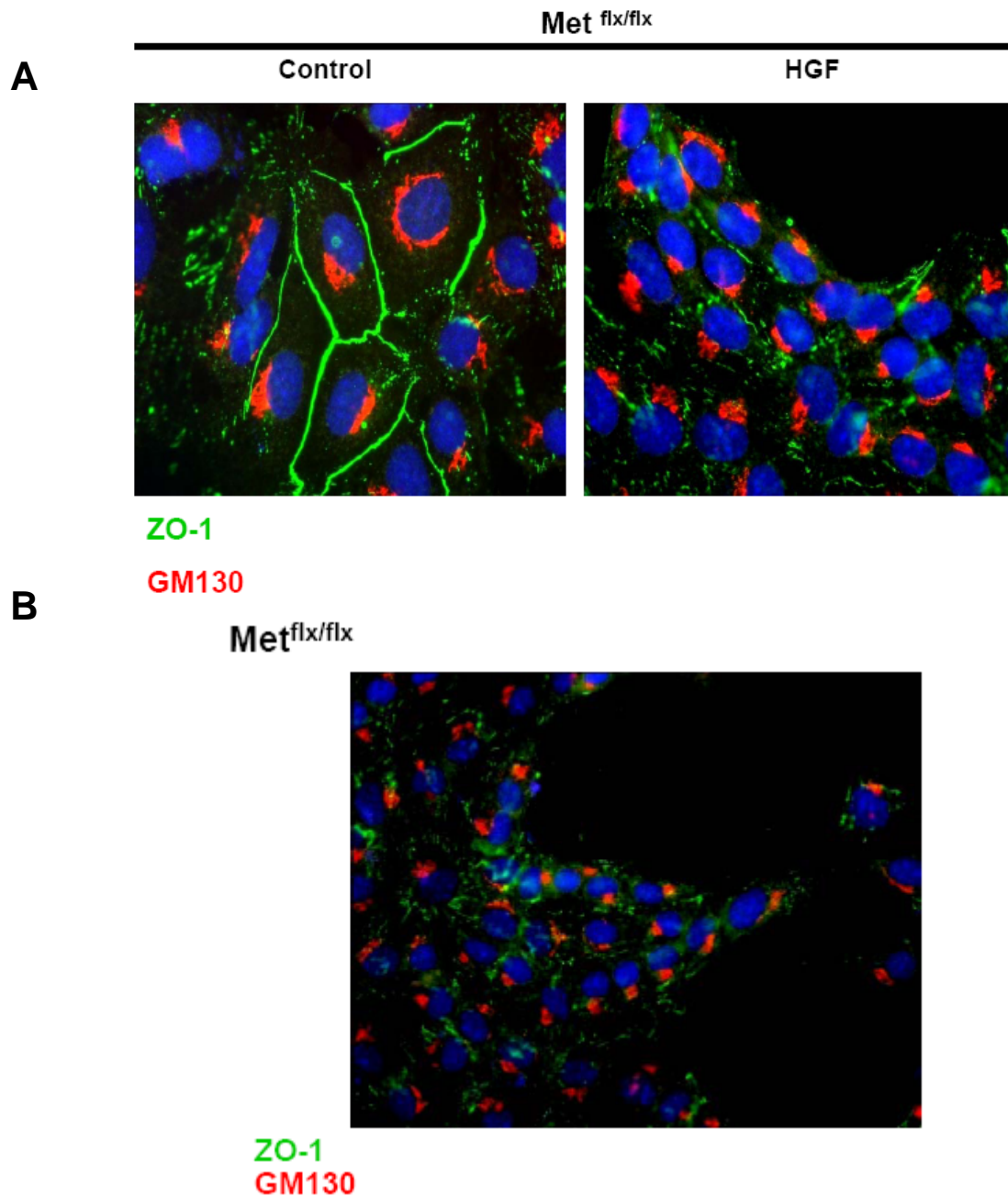
Golgi (Nakamura et al. 1995), analizándose posteriormente en un microscopio confocal. En la *figura 33* se observa claramente que, a diferencia de las células control, bajo tratamiento con HGF un gran número de células ovas Met<sup>flx/flx</sup> presentan un aparato de Golgi muy compactado, orientado hacia una zona muy concreta de la célula, coincidiendo aparentemente con el frente de avance de la misma. Esta reorientación del Golgi es ya evidente a las pocas horas de tratamiento (6 horas), pero es incluso más clara a tiempos más largos (24 horas), en los que se aprecia además la organización alineada celular, y se intuye un proceso de migración mucho más polarizado. En las células Met<sup>-/-</sup> no se observa ningún signo de polarización del Golgi, ni en ausencia ni en presencia de HGF, demostrando la especificidad del proceso.



**Figura 33. Análisis de la distribución del aparato de Golgi en células ovas tratadas con HGF.** Células ovas Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup> fueron cultivadas en placas de plástico en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml). A los tiempos de tratamiento indicados las células se fijaron y tiñeron con anti-B-COP para la visualización del Golgi por microscopía confocal. Se muestran imágenes de campos representativos de cada condición, correspondientes a un experimento, de 3 realizados.

Resultados análogos fueron obtenidos usando el anticuerpo frente a GM130, como se puede ver en la *figura 34 A*, donde se muestran imágenes correspondientes a la doble tinción GM130/ZO-1, que reflejan claramente la organización celular en hileras, la internalización de ZO-1 y la compactación/polarización del Golgi, en células ovas Met<sup>flx/flx</sup> tratadas con HGF, tanto en cultivo normal (*figura 34A*), como en el modelo de cierre de brecha (*figura 34B*).

En base a todos los resultados mostrados hasta ahora, podemos proponer que la ruta de HGF/c-Met en las células ovas parece estar induciendo un proceso de migración en grupo o migración colectiva de células polarizadas.



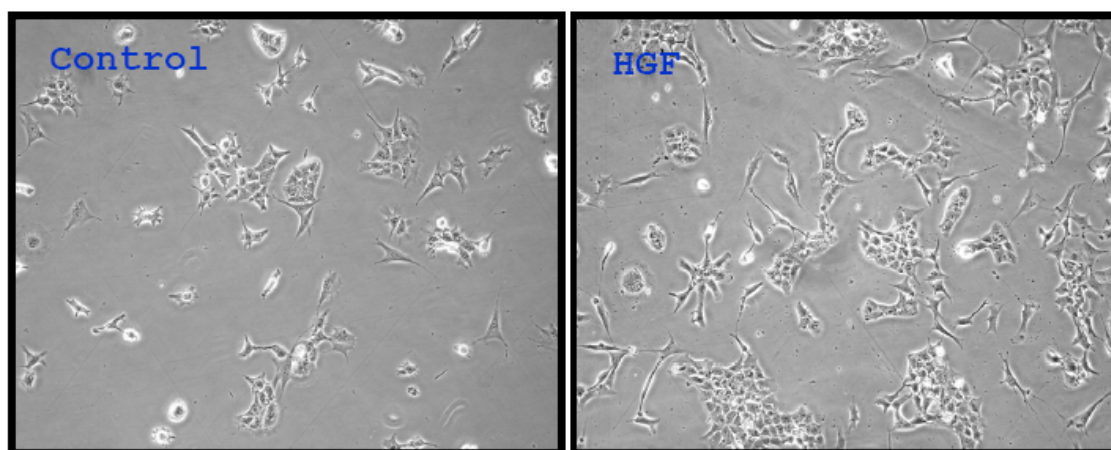
**Figura 34. Análisis por inmunofluorescencia de la distribución subcelular del Golgi y de la proteína ZO-1 en células ovas Met<sup>flx/flx</sup> tratadas con HGF.** Células ovas Met<sup>flx/flx</sup> fueron cultivadas en placas de plástico e incubadas en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml) durante 24h-48h. Posteriormente, las células se fijaron y tiñeron con anticuerpos anti-ZO-1 (verde) y anti- GM130 (rojo). Para la visualización en un microscopio de fluorescencia confocal se usaron anticuerpos secundarios acoplados a AlexaFluor 488 y AlexaFluor 594, respectivamente. **A.** Ensayo de inmunofluorescencia con doble marcaje para ZO-1 (verde) y GM130 (rojo) en células en cultivo normal. Se muestran imágenes representativas correspondientes a 24h de cultivo con o sin HGF, de un experimento de 2 realizados. **B.** Ensayo de inmunofluorescencia con doble marcaje para ZO-1 (verde) y GM130 (rojo) en el modelo de cierre de herida. Se muestran imágenes representativas correspondientes a 48h de tratamiento con HGF.



### 3. ANÁLISIS DEL EFECTO DE HGF SOBRE LA MIGRACIÓN E INVASIÓN DE LOS HEPATOCITOS.

#### 3.1. El HGF no promueve la dispersión, pero sí la migración e invasión *in vitro* de hepatocitos neonatales, a través de matriz extracelular.

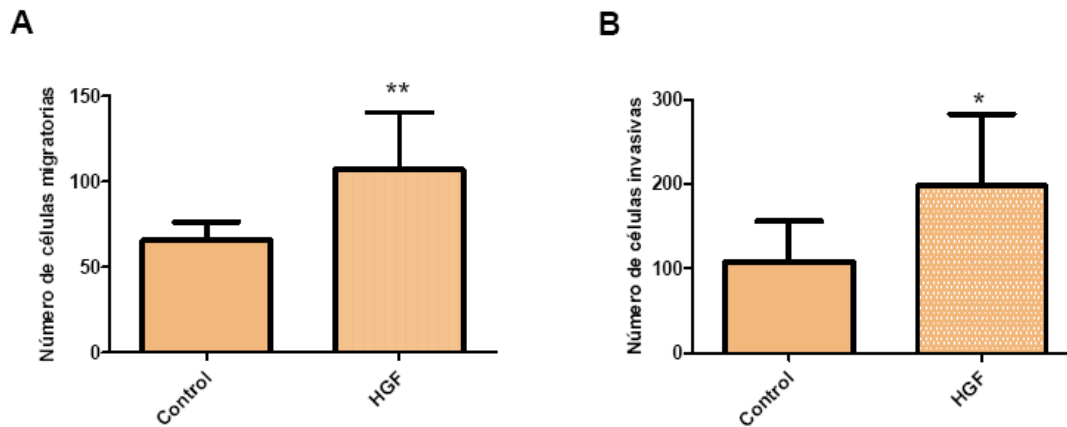
Dado que los estudios realizados en células ovals revelan que el HGF, a través de su receptor c-Met, induce un fenómeno migratorio específico distinto al que se ha descrito en otros sistemas celulares, quisimos hacer un estudio comparativo en otro modelo celular, para ver si esta respuesta es exclusiva de las células ovals o se observa también en células epiteliales ya diferenciadas, como son los hepatocitos. Para ello, hemos realizado el mismo abordaje experimental que con las células ovals, pero utilizando una línea celular inmortalizada de hepatocitos neonatales generada en el laboratorio de la Dra. Angela M. Martínez Valverde (IIB/CSIC, Madrid). Este estudio se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Isabel Fabregat en el IDIBELL. Estas células han sido previamente caracterizadas y validadas, demostrando ser un buen modelo para estudios *in vitro* (Valverde et al. 2003). Como se muestra en la *figura 35*, el tratamiento con HGF tampoco induce en hepatocitos una dispersión generalizada de las células, evidenciado por la presencia de grupos o colonias de células en presencia del factor. Sin embargo, es importante destacar, que a diferencia de las células ovals, los hepatocitos no muestran aparentemente una organización clara en hileras, ni de otro tipo, dentro de las colonias, lo que parece indicar que este fenómeno es específico de células ovals.



**Figura 35. Morfología de los hepatocitos neonatales en cultivo.** Imágenes representativas obtenidas por microscopia de contraste de fases de los hepatocitos neonatales cultivados en ausencia (control) o presencia de HGF (40ng/ml) durante 24 horas.

De igual manera que en las células ovals, a continuación analizamos la capacidad migratoria e invasiva de los hepatocitos neonatales, mediante ensayos de migración/invasión a través de cámaras *transwells* cubiertas con colágeno IV, o matrigel, en ausencia o presencia de

HGF (40ng/ml) durante 24h. Los resultados demostraban que los hepatocitos neonatales en presencia del HGF incrementan significativamente su capacidad para migrar/invasir tanto a través de colágeno IV, como de matrigel ( $P < 0.008$  y  $P < 0.0379$ , respectivamente) (figura 36) respecto a las células no tratadas (control).

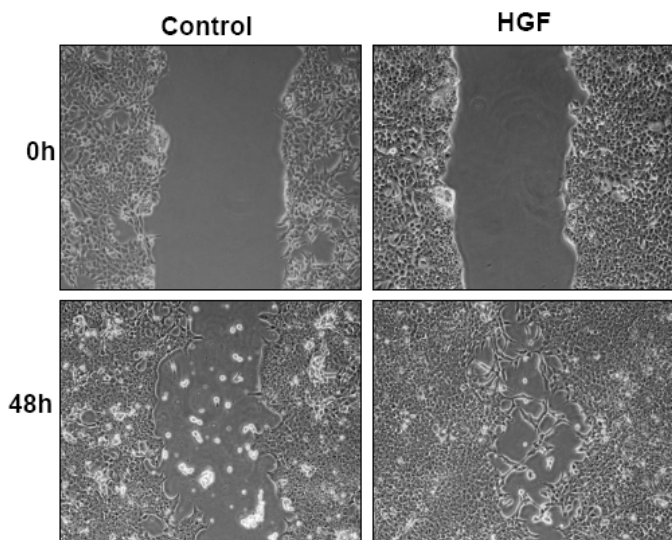
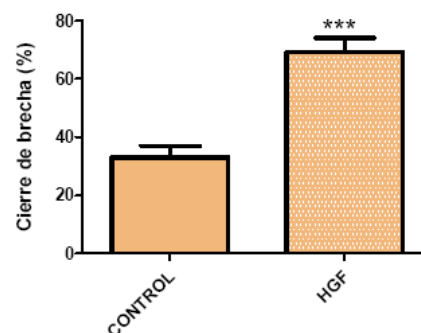


**Figura 36. Análisis del efecto del HGF sobre la migración/invasión de los hepatocitos neonatales a través de cámaras *transwell* cubiertas con colágeno IV (A) o matrigel (B).** Las células fueron sembradas en la cámara superior sobre filtros previamente cubiertos e incubadas durante 24h en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml). Los datos son la media $\pm$ SEM de 3 experimentos. \* $P < 0.0379$ , \*\* $P < 0.008$ .

### 3.2. El HGF favorece el proceso migratorio dirigido al cierre de herida en hepatocitos.

Seguidamente realizamos el ensayo de cierre de herida con hepatocitos, de la misma forma descrita anteriormente para células ovals. Una vez más, y en consonancia con los resultados obtenidos en células ovals, el HGF era capaz de inducir de forma significativa la migración dirigida al cierre de herida ( $p < 0.0001$ ) en hepatocitos neonatales (figura 37). Sin embargo, tampoco en estas condiciones se observa organización en hileras de las células. Además, en el caso de los hepatocitos, se observan numerosas células aisladas o con escasos contactos célula-célula en la zona de la brecha, lo que sugiere que el tipo de migración podría diferir del observado en células ovals, donde la migración parece corresponder al menos mayoritariamente a una migración de tipo colectiva.

Todos estos resultados demostraban que el HGF induce en hepatocitos neonatales, al igual que en células ovals, una respuesta pro-migratoria/pro-invasiva. No está claro, sin embargo, que esta respuesta sea equivalente, dado que en hepatocitos no se observa la inducción de una organización específica de las células en el cultivo.

**A****B**

**Figura 37. Efecto del HGF sobre la migración *in vitro* de hepatocitos. Ensayos de cierre de brecha.** Las células se sometieron a ensayos de cierre de herida según lo descrito anteriormente, durante 48h en presencia o ausencia de HGF (40ng/ml). **A.** Imágenes de microscopía de contraste de fases de los cultivos a 0h (tras realizar la herida) y a 48h de tratamiento. Cada imagen es representativa de al menos 5 campos seleccionados aleatoriamente de 3 experimentos independientes. **B.** Gráfica cuantitativa que representa el porcentaje del cierre de herida a las 48h, teniendo en cuenta el área de la brecha inicial y después de 48h, medido mediante el programa ImageJ. Los datos representan la media±S.E.M. de 3 experimentos independientes. \*\*\*P< 0,0001 respecto al control.

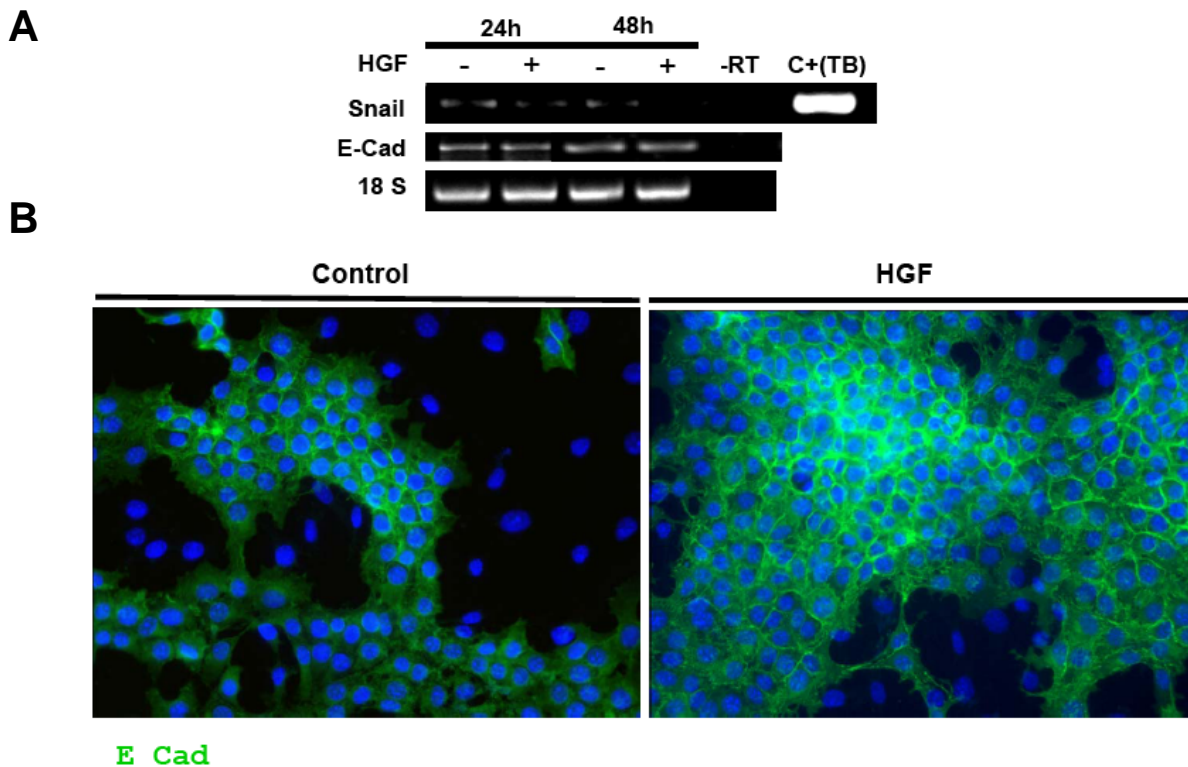
### 3.3. El fenotipo migratorio inducido por HGF en hepatocitos no está asociado a un proceso de EMT, ni a la relocalización de ZO-1, ni a la compactación del Golgi.

Para completar el estudio comparativo entre las respuestas inducidas por HGF en células ovales y hepatocitos, analizamos también algunos de los rasgos característicos de la respuesta pro-migratoria/pro-invasiva mediada por HGF, identificado previamente en células ovales. Así, en primer lugar analizamos la posibilidad de que el HGF indujese un proceso de EMT en estas células. Los resultados fueron de nuevo negativos, ya que no se observó inducción de Snail, y tampoco una disminución de la expresión de E-cadherina, bajo tratamiento con HGF, ni a nivel del mRNA ni de la proteína (*figura 38 A y B*). Las imágenes de microscopía de fluorescencia muestran un patrón de expresión de E-cadherina característico de células epiteliales, mayoritariamente localizada en la superficie celular, en zonas de contacto célula-célula, tanto en ausencia como en presencia de HGF (*figura 38 B*).

Además de la E-cadherina, analizamos la expresión y distribución subcelular de otros marcadores de adhesión célula-célula y polarización. A diferencia de lo descrito anteriormente en células ovales, no hemos observado una internalización clara de ZO-1 en hepatocitos tratados con HGF, con respecto a los hepatocitos control (*figura 39*). Tampoco se observan cambios aparentemente significativos en la distribución de B-COP que evidenciasen una

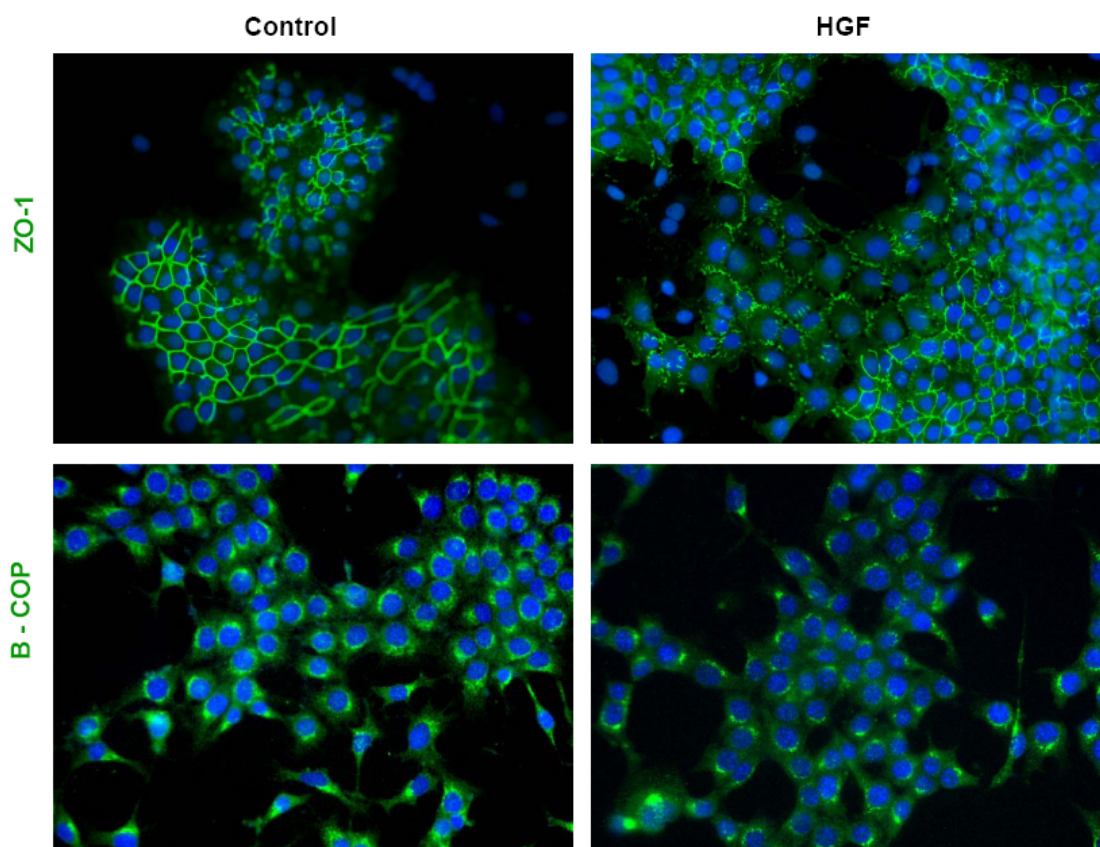


compactación o polarización del Golgi en presencia del factor, y que pudieran sugerir una migración polarizada de las células (*figura 39*).



**Figura 38. Análisis del efecto del HGF en la transición epitelio-mesénquima en hepatocitos.** Las células se mantuvieron en medio DMEM sin suero con o sin HGF (40ng/ml) durante 24h. **A. Análisis por RT-PCR de los niveles de mRNA de Snail y E-cadherina.** Se muestra el RNA ribosomal 18S como control de carga. Como control positivo para Snail se usó RNA de células ovas tratadas durante 24h con TGF- $\beta$ .. **B. Análisis de la expresión y localización subcelular de E-cadherina por Microscopía de Fluorescencia.** E-cadherina fue detectada con un anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor 488 y la tinción nuclear se realizó mediante incubación con DAPI.

Todos estos datos, en conjunto, indicarían que el HGF induce tanto en células ovas como en hepatocitos, un proceso migratorio, pero dicho proceso no es totalmente equivalente en los dos tipos celulares. En particular, los resultados parecen sugerir que en células ovas, el HGF induce una migración en grupo polarizada, que en último término conduce a la reorganización celular, posiblemente emulando un proceso de morfogénesis *in vivo*, fenómeno que no se observa en hepatocitos.



**Figura 39. Análisis de la distribución subcelular de ZO-1 y el Aparato de Golgi en hepatocitos neonatales.** Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a células cultivadas durante 48h en ausencia o presencia de HGF (40ng/ml), fijadas y teñidas con un anticuerpo específico para ZO-1, o un anticuerpo para B-COP. Los núcleos se visualizan en azul por tinción con DAPI. Se muestran imágenes de campos representativos de cada condición, correspondientes a un experimento de 2 realizados.

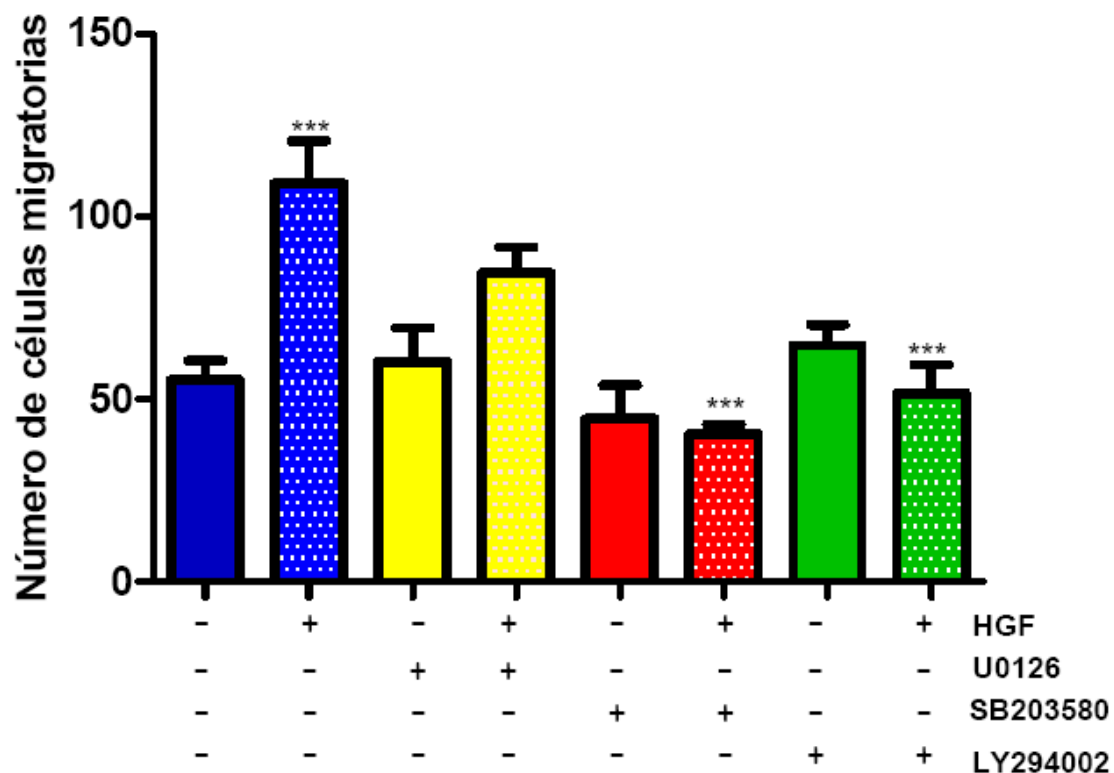
#### **4. ESTUDIO DE LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN QUE MEDIAN LOS PROCESOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN INDUCIDOS POR HGF EN CÉLULAS OVALES.**

Para elucidar los mecanismos moleculares a través de los cuales el HGF induce migración e invasión, hemos utilizado la misma metodología descrita anteriormente, ensayos de migración/invasión a través de matriz extracelular, mediante el uso de cámaras *transwell*, y ensayos de cierre de herida *in vitro*.

##### **4.1. Las vías de señalización de PI3K y p38-MAPK contribuyen a la migración/invasión de células ovas a través de colágeno IV, inducida por HGF.**

Como ya hemos mostrado anteriormente (*figura 23*), el HGF promueve la migración/invasión de las células ovas  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  a través de cámaras *transwell* cubiertas con

colágeno IV. Datos previos del grupo han demostrado que el HGF en células ovals induce la activación de distintas rutas de señalización, entre las que se encuentran las rutas de PI3K/AKT, ERK1/2-MAPKs (del Castillo et al, 2008; Martínez-Palacián et al, 2012), y p38-MAPK (datos no publicados). Para analizar qué rutas y moléculas de señalización mediaban este efecto, utilizamos inhibidores específicos para estas quinasas, LY294002, inhibidor de PI3K, UO126, inhibidor de ERK1/2-MAPKs, SB203580, inhibidor de p38 $\alpha/\beta$ -MAPK. Tal y como se muestra en la *figura 40*, cuando las células fueron tratadas con LY294002 (5  $\mu$ M) y SB203580 (10  $\mu$ M), observamos un bloqueo total ( $P=0,0006$  y  $P=0,0001$ , respectivamente) del efecto promigratorio/pro-invasivo inducido por el HGF en las células ovals Met<sup>flx/flx</sup>. Los resultados con



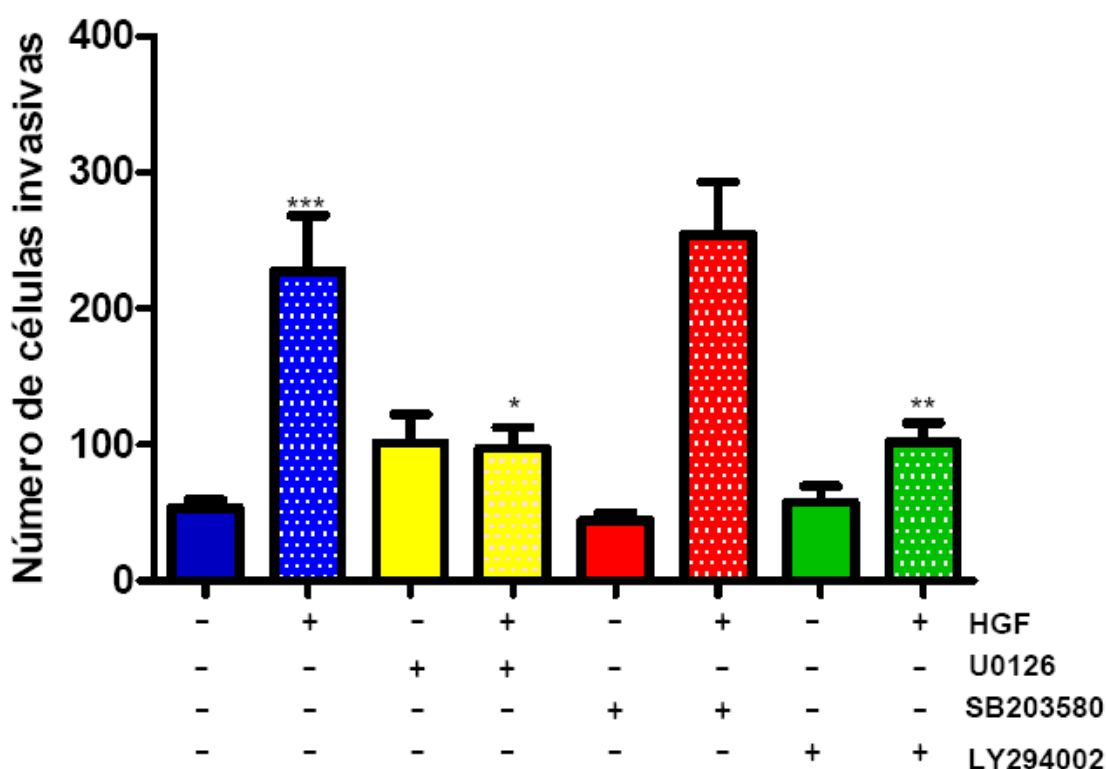
**Figura 40. Análisis del efecto de los inhibidores de quinasas sobre la migración/invasión de células ovals a través de colágeno IV.** Las células fueron sembradas en cámaras *transwell* previamente cubiertas con colágeno IV, e incubadas durante 24h en presencia o ausencia de los tratamientos indicados. HGF (40ng/ml), LY294002 (5 $\mu$ M), UO126 (5 $\mu$ M), SB203580 (10  $\mu$ M). Se muestra una gráfica cuantitativa del número total de células que migran a través del filtro. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM de tres experimentos. \*\*\* $P < 0,001$ , respecto al HGF solo.

UO126 (5 $\mu$ M) no son tan claros. No se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al HGF solo ( $P=0,0963$ ), pero si se analizan los datos de HGF en presencia de UO126 con respecto al inhibidor solo, el aumento del número de células migratorias tampoco es significativo ( $P=0,1097$ ). Se realizarán más experimentos para clarificar este punto. Por el momento, estos datos proporcionan una evidencia sólida de que tanto la activación de PI3K

como de p38 MAPK son necesarias para el efecto del HGF de promover la migración/invasión de células ovas a través de colágeno IV.

#### 4.2 Las vías de señalización de PI3K y ERK1/2-MAPKs contribuyen a la migración/invasión de células ovas a través de matrigel, inducida por HGF.

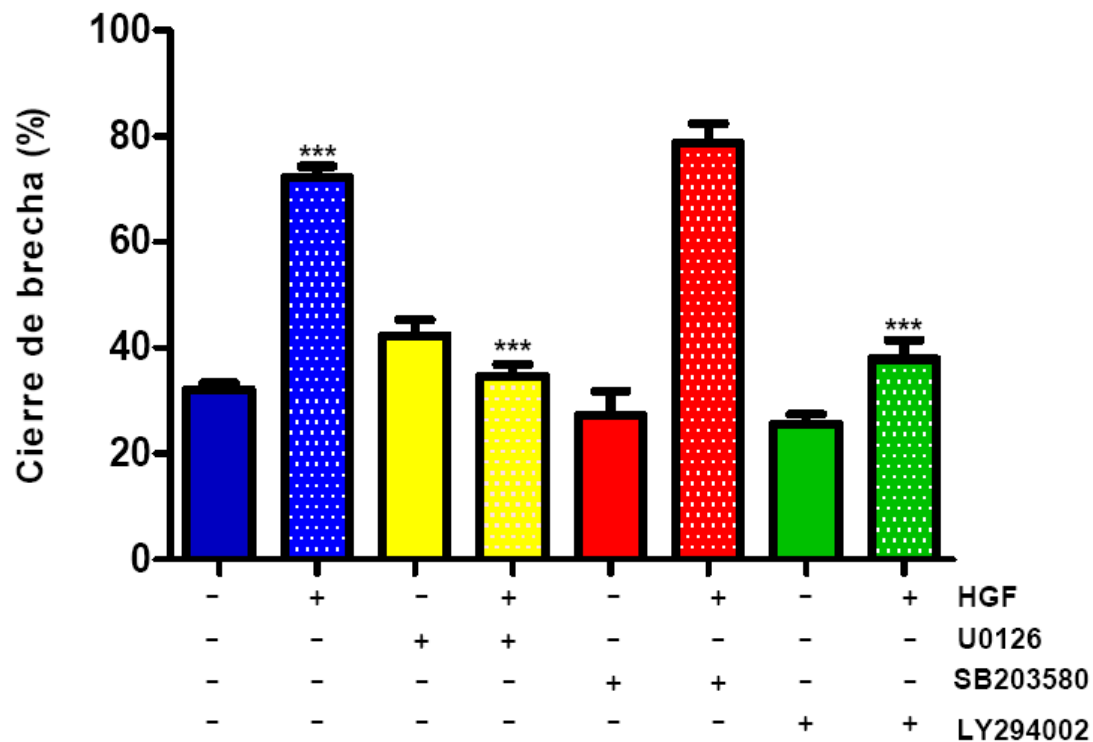
En paralelo a los experimentos anteriores, se analizó el efecto de los inhibidores sobre la capacidad de las células ovas de migrar/invadir a través de matrigel. En la *figura 41* se puede ver cómo el efecto del HGF de aumentar la capacidad de invasión de las células ovas es completamente inhibido cuando se inhibe la activación de ERK1/2-MAPK ( $P=0,0351$ ), y es disminuido significativamente ( $P=0,0014$ ) en presencia del inhibidor de PI3K. Por el contrario, la inhibición de p38-MAPK no tiene ningún efecto ( $P=0,6421$ , respecto al HGF solo.  $P=0,0025$ , respecto al SB203580 solo). Estos resultados indican que la activación de PI3K y ERK1/2-MAPKs mediada por HGF es necesaria para la actividad pro-invasiva del HGF en las células ovas.



**Figura 41. Análisis del efecto de los inhibidores de quinasas sobre la migración/invasión *in vitro* de células ovas a través de matrigel.** Células ovas  $Met^{flx/flx}$  fueron sometidas a ensayos de invasión en cámaras *transwell* cubiertas con matrigel, durante 24h en ausencia o presencia de los tratamientos indicados: HGF (40ng/ml), LY294002 (5 $\mu$ M), U0126 (5 $\mu$ M). Se muestra una gráfica cuantitativa del número total de células que invaden la matriz en cada condición. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM de siete experimentos. \*  $P < 0,001$  (H+U/H). \*\* $P < 0,01$  (H+LY/H). \*\*\* $P < 0,05$  (H/C).

#### 4.3. Las vías de señalización de PI3K y ERK1/2-MAPKs contribuyen al incremento inducido por HGF de la capacidad de las células ovas para migrar de forma dirigida hacia el cierre de herida.

Siguiendo con los estudios de los mecanismos moleculares que median el efecto promigratorio inducido por HGF en las células ovas, realizamos algunos experimentos con el fin de investigar si las mismas rutas de señalización que median la migración/invasión a través de matriz extracelular son también importantes en este proceso de migración dirigida inducido por el HGF en las células ovas. Así, las células ovas  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  fueron cultivadas y sometidas a ensayos de cierre de herida de la misma manera descrita anteriormente (ver apartado 1.3. de resultados), en ausencia o presencia de HGF (40 ng/ml) y/o los distintos inhibidores de quinasas específicos, LY294002, SB203580, y UO126 durante 48 horas. Como se observa en la figura 42, cuando las células fueron incubadas en presencia de UO126 y LY294002 se produce un bloqueo significativo ( $P < 0.0001$ ) del efecto migratorio inducido por



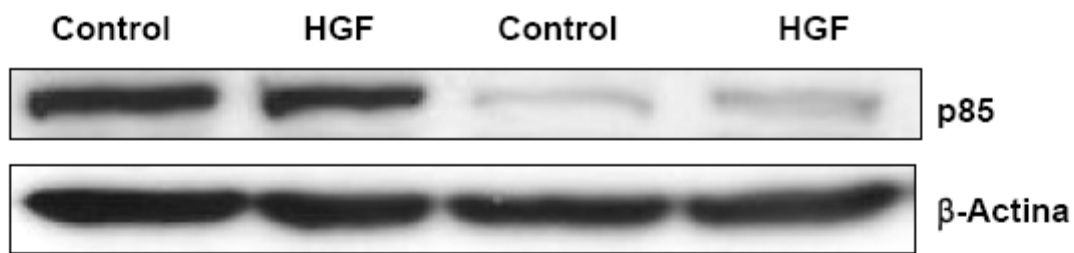
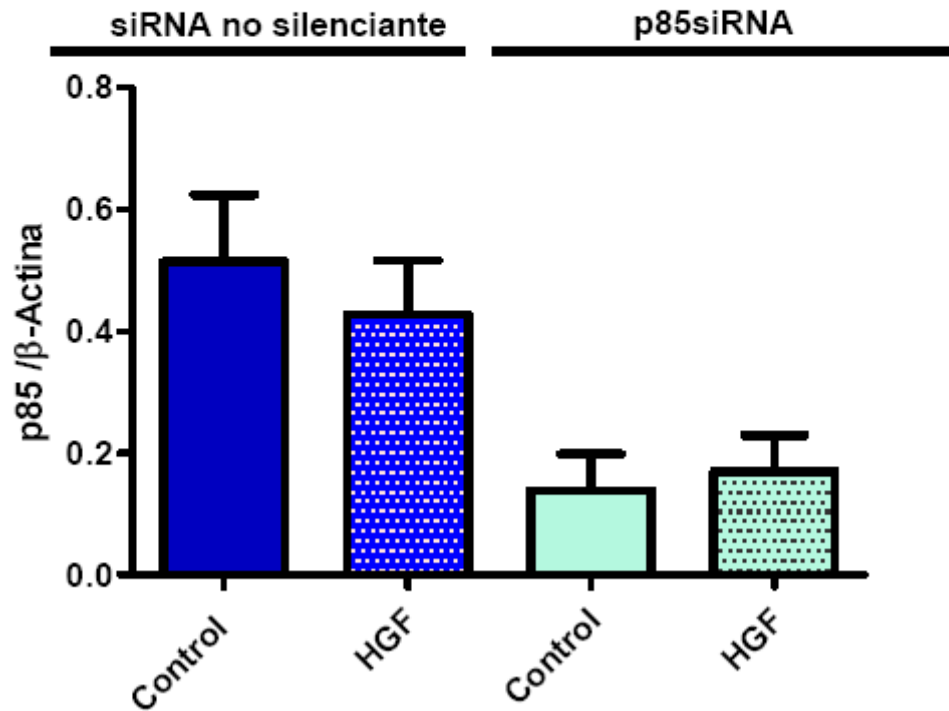
**Figura 42. Análisis del efecto de los inhibidores de quinasas sobre la migración dirigida al cierre de herida en células ovas.** Células ovas  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  se sembraron como se describe previamente y se sometieron a ensayos de cierre de herida durante 48h en presencia de los tratamientos indicados: HGF (40ng/ml), SB203580 (10 $\mu$ M), UO126 (5 $\mu$ M), LY294002 (5 $\mu$ M). Se muestra una gráfica cuantitativa del cierre de herida a las 48h correspondiente a la media  $\pm$ SEM de ocho experimentos. \*\*\* $P < 0,001$  (H/C, H+U/H, H+LY/H).

HGF, efecto que no se observa cuando se incuban con SB203580. Estos resultados, parecen indicar que el fenómeno migratorio que conduce al cierre de herida inducido por HGF en células Met<sup>flx/flx</sup> requiere la activación de las ERK1/2-MAPKs y PI3K, pero es independiente de la activación de p38-MAPK.

#### **4.4. Efecto del silenciamiento de la subunidad reguladora (p85) de PI3K sobre la capacidad migratoria e invasiva de las células ovas.**

Los resultados anteriores evidenciaban un papel importante para PI3K en la inducción mediada por HGF de la capacidad migratoria/invasiva de las células ovas, tanto a través de matriz extracelular, colágeno IV y matrigel, como en el modelo de cierre de herida. Con el fin de comprobar de una manera más elegante la participación de la ruta PI3K/AKT en estas actividades biológicas inducidas por el HGF, realizamos experimentos de silenciamiento por siRNA de la subunidad reguladora (p85) de PI3K, utilizando la metodología puesta a punto en el grupo de la Dra Isabel Fabregat en el IDIBELL, descrita en materiales y métodos. En primer lugar, determinamos el grado de silenciamiento alcanzado midiendo los niveles de proteína de la subunidad p85 mediante *western blot*. Para ello, las células ovas Met<sup>flx/flx</sup> fueron sembradas a 70% de confluencia y 8 horas después de la transfección se trataron con HGF durante 24 horas. Como se muestra en la *figura 43A*, las células transfectadas con la mezcla de siRNA específicos presentan unos niveles de p85 claramente más bajos que las células transfectadas con el siRNA no específico o no silenciante (*non-targeting* siRNA). Específicamente, el grado de silenciamiento a nivel proteico en estas condiciones fue aproximadamente del 70% (*figura 43B*).

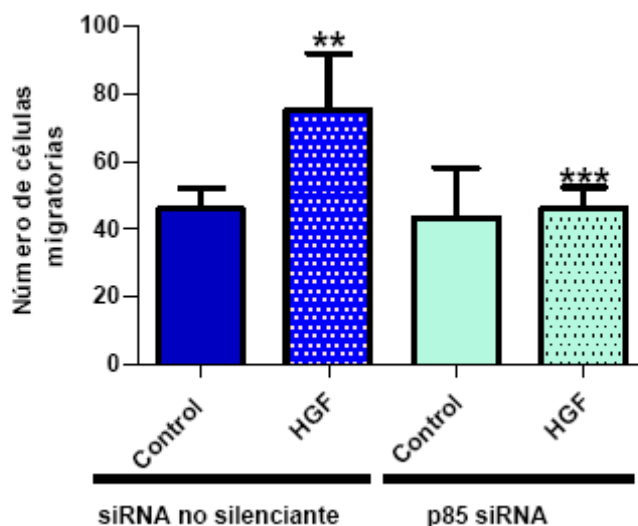
Una vez validamos el silenciamiento génico de la subunidad reguladora (p85) de PI3K realizamos los ensayos con cámaras *transwell* cubiertos con colágeno IV o con matrigel, utilizando las células ovas Met<sup>flx/flx</sup> previamente transfectadas con los diferentes siRNAs. Como se muestra en las *figuras 44 y 45*, el silenciamiento génico de p85-PI3K inhibió

**A****B**

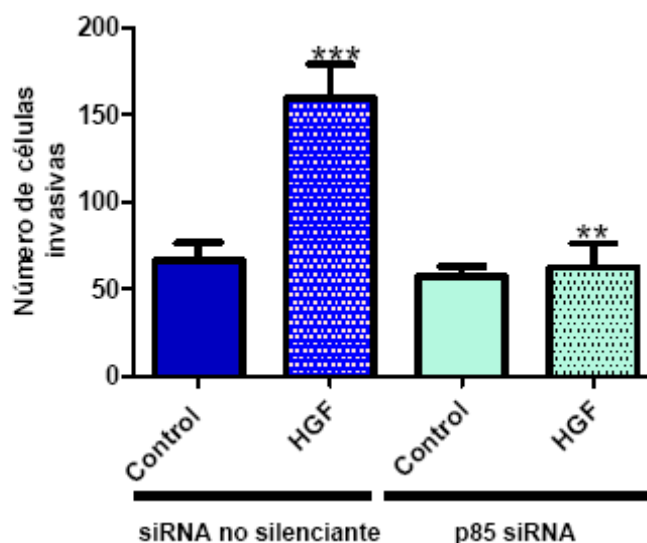
**Figura 43. Análisis de la eficiencia de silenciamiento de p85.** Células ovas Met<sup>flx/flx</sup> se transfectaron con una mezcla de siRNA específicos para silenciar la subunidad reguladora (P85) de PI3K (50nM). Al día siguiente, las células se incubaron con o sin HGF (40ng/ml) durante 24h. **A.** Análisis por *western blot* de los niveles de expresión de la proteína p85. Se utilizó β-actina como control de carga. Se muestra un experimento representativo. **B.** Cuantificación del nivel de silenciamiento mediante análisis densitométrico de los *blots*. Los datos corresponden a la media ± SEM de tres experimentos.

completamente el efecto pro-migratorio/pro-invasivo inducido por el HGF en las células Met<sup>flx/flx</sup>, tanto a través de colágeno IV, como a través de matrigel (P=0,0007 y P=0,0014 respectivamente), demostrando así, inequívocamente, que la activación de PI3K mediada por HGF es responsable de su actividad pro-migratoria/pro-invasiva en células ovas.





**Figura 44. Análisis del efecto del silenciamiento de p85 sobre la migración/invasión *in vitro* de células ovas Met<sup>flx/flx</sup> a través de colágeno IV.** Células ovas Met<sup>flx/flx</sup> fueron transfectadas como se describe previamente. Al día siguiente se tripsinizaron y sembraron en las cámaras *transwell* cubiertas con colágeno IV, y se cultivaron durante 24 horas en ausencia o presencia de HGF. La gráfica muestra la cuantificación del número de células que atraviesan el filtro en las condiciones indicadas. Los datos son la media ± SEM de 2 experimentos. \*\*P< 0,01 respecto al control. \*\*\*P< 0,001, respecto al HGF (siRNA no silenciante).



**Figura 45. Análisis del efecto del silenciamiento de p85 sobre la invasión *in vitro* de células ovas Met<sup>flx/flx</sup> a través de Matrigel.** Las células ovas Met<sup>flx/flx</sup> fueron tratadas como se describe en la figura 44. La gráfica muestra la cuantificación del número de células que atraviesan el filtro cubierto con matrigel en las condiciones indicadas. Los datos son la media ± SEM de 5 experimentos. \*\*\*P< 0,001 respecto a su control. \*\*P< 0,01 respecto a HGF (siRNA no silenciante).



## 5. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN POR HGF DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN Y MATRIZ EXTRACELULAR.

En un intento de conocer con más detalle el proceso de migración e invasión inducido por HGF en células ovales, y dado que, como se ha comentado en el apartado de introducción de esta memoria, las interacciones célula-célula y célula-matriz juegan un papel crucial en los procesos migratorios y de invasión, hemos realizado un estudio de perfil de expresión génica de moléculas implicadas en la adhesión célula-matriz, tales como proteínas de ECM, proteínas de citoesqueleto, receptores de adhesión, metaloproteasas y otras enzimas remodeladoras de la ECM, entre otras (*figura 46*), utilizando la tecnología de PCR arrays. Nuestra hipótesis es que estos estudios podrían permitirnos identificar posibles moléculas diana reguladas por HGF y que jugaran un papel importante en su actividad pro-migratoria/pro-invasiva.

Para llevar a cabo este estudio, utilizamos células ovales Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup>, sembradas a 70% de confluencia y cultivadas con o sin tratamiento con HGF durante 24 y 48 horas. Para el análisis de los resultados se usó el programa informático (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) diseñado por la casa comercial. La normalización de los datos se realizó usando la media de 3 genes normalizadores incluidos en el array: beta glucoronidasa (Gusb), hipoxantina- guanina- fosforibosil- transferasa (Hprt), y

Adams1	Adams2	Adams5	Adams8	Ctnn1	Ctnn2	Ctnn3	Cd44	Cdh1	Cdh2	Cdh3	Cdh4
A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
Cntn1	Col1a1	Col2a1	Col3a1	Col4a1	Col4a2	Col4a3	Col5a1	Col6a1	Vcan	Ctgf	Ecm1
B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
Emilin1	Entpd1	Fln1	Fln1	Hsp11	Hc	Icam1	Itga2	Itga3	Itga4	Itga5	Itgae
C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
Itgal	Itgam	Itgav	Itgax	Itgb1	Itgb2	Itgb3	Itgb4	Lama1	Lama2	Lama3	Lamb2
D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
Lamb3	Lamc1	Mmp10	Mmp11	Mmp12	Mmp13	Mmp14	Mmp15	Mmp1a	Mmp2	Mmp3	Mmp7
E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
Mmp8	Mmp9	Ncam1	Ncam2	Pecam1	Postn	Sele	Seil	Seip	Sgce	Sparc	Spock1
F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
Spp1	Syt1	Tgfb1	Thbs1	Thbs2	Thbs3	Timp1	Timp2	Timp3	Tnc	Vcam1	Vtn
G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
Gusb	Hprt1	Hsp90ab1	Gapdh	Actb	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC
H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

**Figura 46.** Esquema de la placa de PCR con los distintos genes analizados en el array y su posición en la placa.

la proteína de choque térmico 90, alfa citosólica de clase B, miembro1 (Hsp90ab1). Una vez que los datos se normalizaron, se llevó a cabo la comparación de expresión de los genes en las células ovales Met<sup>flx/flx</sup> y Met<sup>-/-</sup> tratadas o no con HGF

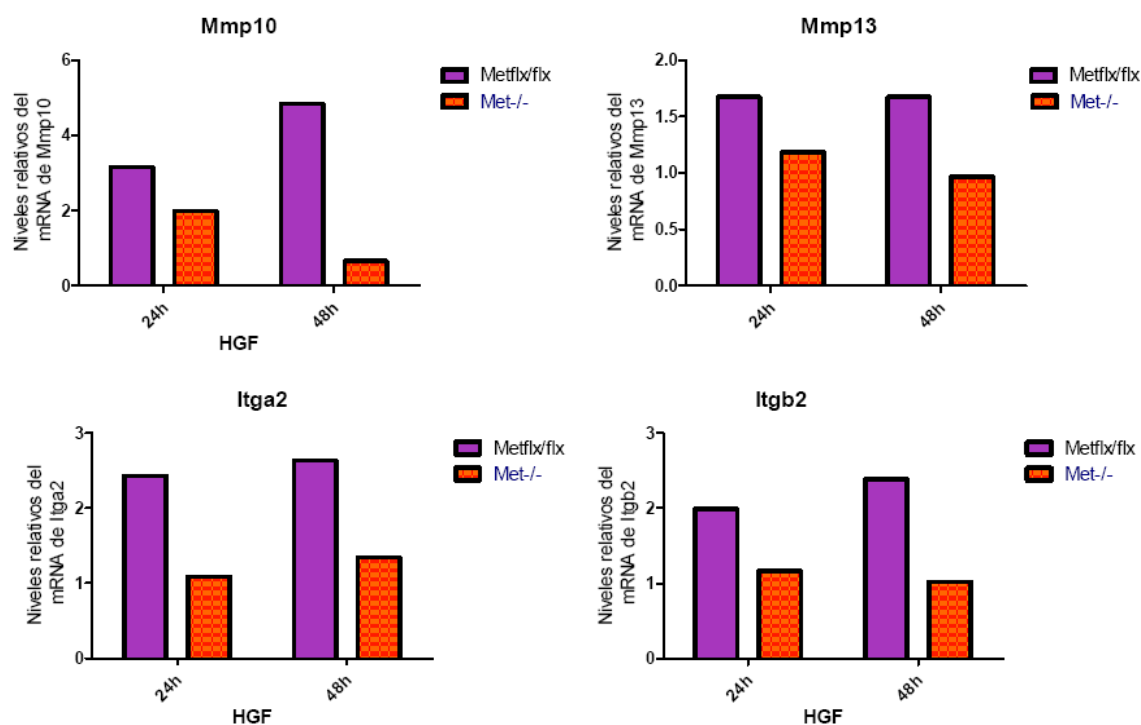
Aunque en este primer análisis nos hemos centrado en buscar genes que muestran una expresión diferencial bajo tratamiento con HGF exógeno, hay que mencionar que un 3,6% del total de genes analizados presentan diferencias aparentemente significativas en el perfil de expresión génica basal entre células  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$  y  $\text{Met}^{-/-}$ , lo que parece indicar la existencia de diferencias basales en las propiedades de adhesión celular e interacción con la matriz entre estas células. No obstante, se necesitan estudios más profundos para saber si estas diferencias están asociadas o no directamente a la ausencia de actividad tirosina quinasa de Met. En la **Tabla I** se enumeran los genes regulados por HGF en las células  $\text{Met}^{\text{flx/flx}}$ . Estos resultados, aún preliminares, muestran un panorama general del efecto del HGF sobre el perfil de expresión de las moléculas de adhesión y matriz extracelular en las células ovas. De los 84 genes evaluados, el 27% (23/84) muestra regulación significativa por el HGF, de los cuales el 47,8% (11/23) presenta una inducción solo a 24h, el 78,3% (8/23) presenta una inducción a 48h, y el 26% (6/23) presenta regulación tanto a 24 como a 48h.

Gen	Descripción	Número de acceso a Gen Bank	Inducción a 24h	Inducción a 48h
Col1a1	Colágeno I alfa 1	NM_007742		X
Col4a1	Colágeno IV alfa 1	NM_009931		X
Col4a2	Colágeno IV alfa 2	NM_009932		X
Col5a1	Colágeno V alfa1	NM_015734	X	X
Col6a1	Colágeno VI alfa1	NM_009933		X
Ctnnb1	Beta-catenina (proteína asociada a cadherina)	NM_007614		X
Ecm1	Proteína de matriz extracelular 1	NM_007899		X
Emilin1	Emilina (proteína localizada en la interfase de las microfibrillas de elastina)	NM_133918		X
Entpd1	Ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa 1 o	NM_009848	X	

	CD39			
Fnl	Fibronectina 1	NM_010233		X
Icam1	Molécula de adhesión intercelular 1	NM_010493	X	
Itga2	Integrina alfa 2	NM_008396	X	X
Itga3	Integrina alfa 3	NM_013565		X
Itga4	Integrina alfa 4	Itga4		X
Itga5	Integrina alfa 5	NM_010577		X
Itgb2	Integrina beta 2	NM_008404	X	X
Mmp1a	Metaloproteinasa de matriz 1a	NM_032006		X
Mmp7	Metaloproteinasa de matriz 7	NM_010810	X	
Mmp10	Metaloproteinasa de matriz 10	NM_019471	X	X
Mmp11	Metaloproteinasa de matriz 11	NM_008606	X	
Mmp13	Metaloproteinasa de matriz 13	NM_008607	X	X
Thbs2	Trombospondina 2	NM_011581	X	
Thbs3	Trombospondina 3	NM_013691	X	X

**Tabla I. Genes regulados por HGF en células ovals Met<sup>flx/flx</sup>.**

Tenemos que resaltar que hemos realizado algunos experimentos adicionales para confirmar los resultados obtenidos en el *array*, para lo cual hemos diseñado nuevos oligos específicos para algunos de los genes regulados y hemos analizado su expresión por QRT-PCR. Por el momento hemos analizado los genes Itga2, Itgb2, Mmp10 y Mmp13 y hemos obtenido resultados similares (*figura 47*).



**Figura 47. Análisis por QRT-PCR de la expresión de mmp10, mmp13, itga2, itgb2, en células ovals.** Las células ovals fueron sembradas en placas de plásticos de área 21.29 cm<sup>2</sup> a una densidad del 60% y se mantuvieron con o sin HGF (40 ng/ml) durante los tiempos indicados. Se aisló RNA y se realizó un análisis de los niveles de mRNA de los genes indicados por QRT-PCR según se indica en material y métodos. Los datos corresponden a un experimento representativo.

Estos resultados ponen en evidencia que, como cabía esperar, la respuesta promigratoria/pro-invasiva inducida por HGF en células ovals está asociada a la regulación de la expresión de genes que juegan un papel importante en este tipo de procesos, en particular, varias integrinas, proteínas de matriz extracelular, y metaloproteasas, todos ellos genes implicados en la adhesión célula-matriz y la remodelación de la matriz extracelular.



## **V. DISCUSSION**



Las células ovales son una de las poblaciones de células madre/progenitoras hepáticas más estudiadas y conocidas, no solo por su potencial terapéutico en reparación de daño hepático, sino por su, cada vez más aceptada, implicación en el desarrollo del cáncer de hígado (Alison. 2006; Roskams. 2006; Sell y Leffert. 2008). Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos sobre ellas, en particular las señales y mecanismos moleculares que regulan su función. Resultados previos de nuestro laboratorio, y de otros, han establecido un papel regulador para el HGF sobre algunos aspectos de la biología y función de las células progenitoras hepáticas. Así, el HGF induce la proliferación *in vitro*, tanto en células ovales, procedentes de rata y de ratón; como en otros modelos de células progenitoras de hígado, concretamente células epiteliales no parenquimáticas aisladas de hígado de ratón en estadios embrionario y postnatal (Johnson et al. 1993; Okano et al. 2003; Yao et al. 2004; del Castillo et al. 2008). Por otra parte, en células ovales *in vitro*, el HGF es un factor de supervivencia celular (del Castillo et al. 2008; Martínez-Palacián et al. 2012). El trabajo presentado en esta memoria se ha centrado en el análisis de los efectos del HGF sobre la capacidad migratoria e invasiva de células ovales, usando como modelo líneas de células ovales de ratón que expresan una forma del receptor Met funcional (células Met<sup>flx/flx</sup>) o una forma genéticamente inactivada, carente de actividad tirosina quinasa (células Met<sup>-/-</sup>). Nuestros resultados demuestran que el HGF promueve la migración e invasión a través de proteínas de matriz extracelular (colágeno IV y matrigel) y la migración dirigida al cierre de herida. Más aún, el HGF induce en las células ovales un fenómeno migratorio que no conduce a la dispersión, sino al agrupamiento celular, acompañado posteriormente de una reorganización polarizada de las células en forma de filas o hileras. Estas respuestas son concomitantes con la regulación de la expresión de genes que codifican para proteínas importantes en la unión célula-matriz y la remodelación de la matriz extracelular, entre las que se encuentran integrinas, metaloproteasas, y proteínas de matriz extracelular.

### **HGF: un motógeno y morfógeno en células ovales**

La actividad motogénica inducida por HGF/Met ha sido estudiada en varios tipos celulares y contextos fisiológicos, como la dispersión de las células epiteliales, la migración de los mioblastos en el embrión, o la migración de las neuronas neocorticales durante el desarrollo del cerebro (Bladt et al. 1995; Maina et al. 1996; Powell et al. 2001; Rosario and Birchmeier 2003; Birchmeier et al. 2003). *In vitro*, el sistema celular más ampliamente utilizado para estudiar la actividad pro-migratoria del HGF es la línea de células epiteliales de riñón MDCK, aunque también hay datos en células endoteliales o queratinocitos. En estos modelos, el HGF actúa como un factor “scatter”, induciendo la expansión y posterior dispersión de las células integrantes de una colonia en cultivos bidimensionales en monocapa, a la vez que promueve la



tubulogénesis, o formación de tubos largos y ramificados, en cultivos tridimensionales en geles de colágeno (Matsumoto et al. 1991; Bussolino et al. 1992; Uehara and Kitamura 1992). Una respuesta similar se ha descrito en células epiteliales hepáticas no parenquimáticas de ratón (Johnson et al. 1993). Por el contrario, nuestro trabajo muestra que el fenómeno migratorio inducido por HGF en células ovaes difiere de esta respuesta típica caracterizada, al menos en lo que se refiere a la ausencia de dispersión celular. La migración en células ovaes se asemejaría a la respuesta previamente descrita en hepatocitos. Así, estudios previos realizados en hepatocitos adultos cultivados en geles de colágeno mostraban que los hepatocitos expuestos al HGF desarrollaban inicialmente prolongaciones largas y finas, reflejando un proceso migratorio, para posteriormente establecer contactos intercelulares, dando lugar al agrupamiento celular y a la formación de estructuras en cordón. Estos cambios morfológicos sugerían la inducción de una respuesta morfogénica por parte del HGF (Michalopoulos et al. 1993). Igualmente, se ha descrito la aparición de prolongaciones en hepatocitos cultivados sobre una capa de colágeno (cultivo bidimensional) y en presencia de HGF (Petersen et al. 1994). Aunque los autores interpretaban dichas formaciones como un signo de “*scattering*”, sin embargo, la apariencia del cultivo más bien parece mostrar el establecimiento de contactos intercelulares y la formación de estructuras en cordón ramificadas, que en nada recuerdan al efecto motogénico clásico del HGF ejercido sobre células MDCK. Parece por tanto, que el HGF induce una respuesta migratoria diferente y específica tanto en hepatocitos como en sus progenitores. Apoyando esta idea, es interesante mencionar que usando hepatocitos fetales de rata en cultivo tampoco hemos observado un efecto “*scatter*” claro por tratamiento con HGF. Por el contrario, hemos demostrado la capacidad del HGF y/o EGF, en combinación con el TGF- $\beta$ , de inducir cambios morfológicos similares a los descritos en hepatocitos adultos por Michalopoulos y colaboradores, adoptando las células una disposición en hileras. Además, de forma similar a los resultados obtenidos en células ovaes (figura 26), la formación de dichas estructuras estaba acompañada de cambios en la organización del citoesqueleto, en concreto se observó una reorganización de los filamentos de F-actina que concuerda con un fenotipo migratorio. Es interesante resaltar que esta organización celular es dinámica, y se encuentra en proceso continuo de reorganización (Sánchez et al. 1998). Dichos cambios morfológicos estaban relacionados con la adquisición de un perfil de expresión génica consistente con un estado de diferenciación más avanzado (Sanchez et al. 1995; Fabregat et al. 1996; Sanchez et al. 1998). Los resultados obtenidos en hepatocitos neonatales (apartado 3 de los resultados) concuerdan también con la ausencia de “*scattering*” en las células epiteliales hepáticas tratadas con HGF, aunque en estas células no se observa de forma clara una aparente organización celular. No tenemos aún una explicación para esta discrepancia, pero hay que tener en cuenta que estas células han sido manipuladas genéticamente para su inmortalización y, aunque su caracterización fenotípica indica que conservan algunos de los marcadores más característicos

de los hepatocitos (Valverde et al. 2003), no se puede descartar que se hayan perdido algunas propiedades originales, o que su respuesta al HGF se haya visto modificada.

Está claro que se necesitan más experimentos para definir exactamente el efecto inducido por HGF en células ovales pero, en base a nuestros resultados y a todos los datos expuestos anteriormente, nuestra hipótesis es que en células ovales el HGF no es un simple motógeno, sino más bien un morfógeno dado que es capaz de inducir *in vitro* una respuesta motogénica compleja, que implica la reorganización celular incluso en cultivos bidimensionales, lo que constituye posiblemente parte de un programa morfogénico específico.

La actividad morfogénica del HGF es una de sus actividades biológicas más complejas, pero a la vez interesante y única ya que, al menos *in vitro*, no parece ser inducida por otros factores de crecimiento. Así, cultivadas en una matriz de colágeno, células epiteliales hepáticas no parenquimáticas de ratón forman estructuras alargadas ramificadas minimamente tubularizadas en presencia de HGF, pero no de otros factores como EGF, TGF- $\alpha$ , aFGF, o Insulina (Johnson et al.1993). También en geles de colágeno tipo I, el HGF, pero no el EGF, induce la formación de estructuras ductulares/acinares en hepatocitos adultos en estado proliferativo (Block et al. 1996). Sin embargo, estos dos factores colaboran para inducir una respuesta morfogénica máxima en cultivos mixtos de hepatocitos y células no parenquimáticas de rata en matrigel, que conduce a la formación de una monocapa compuesta de células formando láminas, ductos, y con una red canalicular bien definida, cuyo análisis morfológico y de expresión génica era concordante con un fenotipo de hepatocito maduro (Michalopoulos et al. 1999). El trabajo presentado en esta memoria se ha realizado usando cultivos convencionales, bidimensionales, en ausencia de sustratos de matriz extracelular y en ausencia o presencia de HGF. En estas condiciones no se puede esperar una respuesta morfogénica similar a la observada en cultivos 3D, donde se promueve una estrecha interacción célula-célula y célula-matriz. Aún así, en presencia de HGF se evidencian signos de polarización celular y un intento por parte de las células de formar estructuras organizadas específicas. La organización celular en hileras podría emular la disposición en cordones de los hepatocitos en el parénquima hepático o el proceso de migración que conlleva la expansión de la población de células ovales en el parénquima hepático durante la respuesta regenerativa mediada por estas células. En apoyo del papel morfógeno del HGF en células ovales, hay que mencionar que observaciones de nuestro laboratorio, no incluidas en los resultados de esta memoria, indican que el HGF es capaz de inducir la formación de estructuras complejas, alargadas y ramificadas en células ovales cuando éstas se cultivan en sándwich de colágeno tipo I, sugiriendo la activación de un programa morfogénico completo en estas condiciones. Esta es una línea de investigación que será desarrollada en futuros trabajos en nuestro laboratorio.

### **El HGF induce mayoritariamente la migración colectiva de células ovals**

Los estudios realizados en las dos últimas décadas sobre los procesos de migración celular han permitido reconocer que, además del bien establecido modo de migración basado en el movimiento de células individuales, hay otros tipos de migración, destacando el movimiento de un grupo de células, también conocido como migración colectiva o migración en cohorte o en grupo (Friedl et al. 2004). Los mecanismos moleculares de la migración colectiva no se han determinado con exactitud pero parece claro que, además de la recepción de señales externas, es fundamental la propia comunicación entre las células del grupo y toda esta información se debe traducir en una reorganización intracelular. En definitiva, la estabilización de las interacciones célula-célula es fundamental para mantener el movimiento colectivo (Weijer. 2009; Mayor y Carmona-Fontaine. 2010). Nuestros resultados muestran la convergencia de dos tipos de movimiento celular en células ovals bajo tratamiento con HGF: Por una parte, se observan células individuales que migran para establecer contacto con otras células vecinas, pero por otra, el evento mayoritario en el cultivo es la formación de colonias de células en movimiento. Esto último queda demostrado por la reorganización del citoesqueleto de actina en las células de la periferia de la colonia, que presentan acumulación de actina en puntos de adhesión focal, con la formación de estructuras típicas de células en migración, filopodia y lamelipodia, así como ondulaciones de la membrana celular (*ruffles*) (figura 26), todos ellos signos claros del desarrollo de un citoesqueleto dinámico para establecer contacto con el sustrato. Los ensayos de cierre de herida son un modelo muy ilustrativo y adecuado para caracterizar la respuesta motogénica celular. De nuevo, en presencia del HGF, condición que favorece el cierre de herida, se visualizan algunas células aisladas en la zona de los bordes de la herida, pero el fenómeno mayoritario es la formación de frentes multicelulares que avanzan hacia la herida (figuras 24, 28B, 34B).

El análisis de ZO-1, principal componente de las uniones estrechas celulares, muestra una relocalización de esta proteína desde la membrana celular al citoplasma en presencia de HGF (figura 28), lo que podría sugerir que el HGF está afectando de forma negativa al establecimiento y/o estabilidad de las uniones estrechas y, por tanto, a una disminución de la unión célula-célula. Estos resultados estarían en consonancia con observaciones previas de Grisendi y colaboradores (1998) en células MDCK cultivadas en presencia de bajos niveles de calcio, en las que el HGF causaba una reducción de ZO-1 en los sitios laterales de la membrana y un incremento concomitante en el citoplasma, a su vez asociado con un incremento en la fosforilación en tirosina de  $\beta$ -catenina. Nosotros no hemos analizado la fosforilación de  $\beta$ -catenina pero sí la de ZO-1 (figura 29), lo que nos ha permitido ver que la translocación

intracelular está asociada al aumento de la forma fosforilada de la proteína. Estos datos también concuerdan con resultados previos obtenidos en células epiteliales gástricas no tumorales, donde el HGF altera la localización de ZO-1 disminuyendo su presencia en la membrana y estimula su fosforilación (Hollande et al. 2001). Al igual que en células ovals (figura 27), los autores no observan efecto alguno del HGF sobre los niveles de ZO-1, ni de ocludina, otra proteína integrante de las uniones estrechas, aunque sí demuestran una disminución de la asociación entre ambas proteínas. En contraposición a estos estudios, Pollack y colaboradores (2004) han descrito que la morfogénesis inducida por HGF en células MDCK polarizadas en cultivo en monocapa, que conduce a la formación de capas pseudoestratificadas, transcurre sin pérdida de la integridad funcional de las uniones estrechas. Concretamente, los autores ven que durante este proceso, a pesar de que el HGF altera la localización de ZO-1, no se rompe el anillo pericelular y por tanto se mantienen las barreras de permeabilidad paracelular. Nosotros no tenemos datos adicionales para saber si se mantiene o no dicha barrera y la integridad funcional de las uniones entre células ovals, pero está claro que se mantiene la unión célula-célula, lo que deja abierta dicha hipótesis. Por otra parte, hay que tener en cuenta que las uniones estrechas intercelulares no son solo estructuras de adhesión celular, sino que regulan distintos procesos, que van desde la difusión de moléculas entre células adyacentes al establecimiento de la polaridad, o la señalización celular, pudiendo transmitir señales al interior celular y modular la expresión génica (Matter y Balda. 2003a; 2003b). Por tanto, el papel concreto que juega la internalización de ZO-1 en el proceso migratorio no está claro y podría tener otra/s función/es adicional/es a la propiamente relacionada con la adhesión celular.

Contrariamente a ZO-1, la E-cadherina, proteína implicada en la unión célula-célula integrante de las uniones adherentes, no muestra alteraciones aparentes en su distribución cuando las células se trataron con HGF (figura 32). Curiosamente, las células ovals no presentan un patrón homogéneo de expresión de E-cadherina. A pesar de presentar una abundante expresión en la membrana plasmática, patrón típico de células epiteliales, también se observa expresión intracelular en todas las condiciones de cultivo. No tenemos una explicación clara para este fenómeno. Podría ser un problema técnico, aunque los diferentes intentos hechos para optimizar el protocolo de tinción han dado el mismo resultado. Es posible que sea un reflejo del dinamismo de las células ovals en cultivo, que requiere un continuo ensamblaje y desensamblaje de las uniones intercelulares. Tampoco podemos olvidar la propia naturaleza inmadura y heterogénea de las células ovals, que presentan un fenotipo mixto, con rasgos y marcadores tanto epiteliales como mesenquimáticos (Sarraf et al. 1994; Yovchev et al. 2007). Además, se ha descrito que estas células presentan activación de la vía de wnt/ $\beta$ -catenina (Hu et al. 2007; Apte et al. 2008; Yang et al. 2008). Cualquiera de estas propiedades de la célula oval podría explicar el patrón atípico de E-cadherina. Independientemente de esto, lo que es evidente

es que el HGF no parece tener ningún efecto importante sobre su expresión o localización. Esto contrasta con los resultados obtenidos en células MDCK, en las que la dispersión celular promovida por HGF está asociada a un desensamblaje de las uniones adherentes y la pérdida de expresión de E-cadherina y  $\beta$ -catenina en la membrana celular (Royal y Park. 1995; Potempa y Ridley. 1998), así como a la co-endocitosis de E-cadherina y Met (Kamei et al. 1999). Sin embargo, recientemente, Delgado y colaboradores (2009) han demostrado que el HGF confiere propiedades migratorias e invasivas a hepatoblastos humanos aislados de hígados de entre 10-12 semanas de gestación y que dicho efecto no implica la pérdida de expresión de E-cadherina, ni la translocación de E-cadherina o  $\beta$ -catenina, lo que sugiere que la migración de los hepatoblastos no requiere la desestabilización de las uniones adherentes. Nuestros resultados estarían en total consonancia con estas observaciones y evidencian, una vez más, que los mecanismos que median la actividad pro-migratoria/pro-invasiva del HGF en células epiteliales hepáticas difieren notablemente de los que operan en otros tipos de células epiteliales. Por otra parte, la ausencia de pérdida de E-cadherina, o de cambios en su distribución subcelular, podría considerarse una evidencia más de que la interacción célula-célula se mantiene durante el proceso migratorio y, por tanto, de la naturaleza colectiva de dicho proceso.

La migración de células individuales, en la que se produce una disminución o pérdida de la adhesión célula-célula, suele estar asociada a un proceso de EMT (Thiery y Sleeman. 2006) que puede ser inducido por una variedad de señales extracelulares. El primer inductor de EMT descrito fue el TGF- $\beta$ , sin duda el mejor caracterizado, pero también se han identificado otros, entre los que se encuentran los ligandos del EGFR, FGFs, IGFs y el HGF (Huber et al. 2005). Existe la creencia de que para que las células epiteliales puedan recorrer distancias largas deben sufrir al menos una EMT parcial, que permita a las células disminuir sus fuertes interacciones intercelulares y convertirse en células mesenquimáticas individuales polarizadas con más libertad de movimiento (Montell. 2008; Revenu y Gilmour. 2009). De hecho, se ha demostrado en ciertos tipos de tumores, como el de mama, que las células que sufren hipermetilación transitoria y subsecuente represión de E-cadherina son más invasivas y metastásicas (Graff et al. 2000). Sin embargo, también hay evidencias de que la invasión tumoral puede ocurrir en ausencia de EMT. Así, la podoplanina promueve la invasión de células de cáncer de mama a través de una regulación negativa de la actividad de GTPasas pequeñas de la familia de Rho, que conduce a una remodelación del citoesqueleto de actina, pero no altera la expresión y localización de marcadores de EMT (Wicki et al. 2006). Nuestros resultados demuestran que el HGF, en células ovas, no induce la expresión de Snail, uno de los factores de transcripción más conocidos que induce EMT (Batlle et al. 2000; Cano et al. 2000). Esto, junto al hecho de que no se produzca disminución de la expresión de E-cadherina, un gen diana

de Snail, demuestra que el proceso pro-migratorio/pro-invasivo inducido por HGF no está asociado a EMT.

El papel que juega la EMT en las actividades motogénica e invasiva del HGF no está del todo claro. El análisis detallado del modelo de tubulogénesis epitelial inducido por HGF en células MDCK ha conducido a postular que la EMT es un mecanismo clave durante las fases tempranas del programa de crecimiento invasivo inducido por el HGF (O'Brien et al. 2002; Benvenuti y Comoglio. 2007). Así, a través de la disminución de las uniones celulares, la reorganización del citoesqueleto, el cambio de polaridad celular, o la producción de proteasas, la EMT permitiría a las células moverse a través de la matriz extracelular. La migración e invasión celular iría seguida de la diferenciación, polarización y, en último término, de la generación de nuevas estructuras o morfogénesis, completándose así el programa. Sin embargo, hay que puntualizar que el proceso de EMT inducido durante este programa es transitorio y parcial, ya que las células que sufren dicho proceso permanecen adheridas entre sí (Pollack et al. 1998). No es así en células tumorales hepáticas. De hecho, en células de hepatoblastoma (HepG2), el efecto “*scatter*” del HGF depende de la inducción de Snail, mediada por la vía MAPK/Erg-1, y la consecuente disminución de la expresión de E-cadherina (Grotegut et al. 2006). Asimismo, se ha propuesto que células tumorales de hepatocarcinoma tras sufrir EMT adquieren capacidad para secretar HGF, activándose así un bucle de retroalimentación positiva que contribuye al mantenimiento del estado mesenquimal y de esta forma favorecer la invasión y progresión tumoral (Ding et al. 2010).

A la vista de todos estos datos, parece claro que el HGF tiene la capacidad de inducir EMT, pero que ésta se produzca depende del tipo celular y su contexto y de la respuesta específica disparada. Así, la inducción de una EMT clásica estaría asociada a su capacidad para promover la dispersión celular, mientras que el proceso morfogénico del HGF conlleva, en todo caso, una EMT parcial. Esto concordaría con nuestros datos, que indican la ausencia de EMT tanto en células ovaes como en hepatocitos, dos tipos celulares en los que el HGF no induce dispersión. A su vez, apoyaría nuestra hipótesis de que el HGF induce en las células ovaes un proceso que podría imitar o formar parte del programa morfogénico que sufren estas células *in vivo* en el parénquima hepático durante la reparación del hígado dañado.

La migración de distintos tipos de células, como fibroblastos y astrocitos, entre otras, conlleva una reorientación del aparato de Golgi hacia el frente de migración. Este fenómeno es muy claro en el modelo de migración dirigida al cierre de herida, en el que el Golgi se reorganiza para orientarse hacia la brecha generada. La reorientación del Golgi se cree que puede ser importante para facilitar el transporte de vesículas biosintéticas y de reciclaje a la

región en crecimiento de la membrana plasmática, siendo considerado una evidencia del establecimiento de polaridad celular durante la migración (Nobes y Hall. 1999; Etienne-Manneville y Hall. 2001). Este fenómeno también tiene lugar durante la migración celular que conduce a la formación de cadenas de células en la tubulogénesis *in vitro* de células MDCK (Yu et al. 2003), aunque aquí es más complejo. La mayoría de las células que lideran las cadenas, pero no todas, presentan orientación del Golgi hacia el frente migratorio y, además, las células que ocupan posiciones posteriores no parecen mostrar una orientación definida. Nuestros resultados revelan una fuerte compactación y reorientación del Golgi en una población mayoritaria de las células ovals bajo tratamiento con HGF, tanto en cultivo normal como en el modelo de cierre de herida (figuras 33 y 34). De acuerdo con las observaciones de Yu y colaboradores, la célula situada en el frente de la hilera tiene el Golgi orientado al frente migratorio, no así las células que la siguen, en las que más bien parece que está mayoritariamente concentrado en un lado de la célula. Habría que hacer un análisis cuantitativo detallado de la orientación del Golgi y analizar otros marcadores que nos ayudaran a determinar la polaridad celular para saber si la orientación es aleatoria o, por el contrario, sigue un patrón específico y está asociada a algún dominio celular en particular. En cualquier caso, los datos demuestran claramente que el HGF induce un proceso de polarización del Golgi. El hecho de que se observe tanto en zonas de densidad celular baja como alta (figuras 33 y 34), que sea más evidente a tiempos largos, coincidiendo con la reorganización celular en hileras, y que solo se observe en células ovals, pero no en hepatocitos, sugiere que este fenómeno está estrechamente asociado con el proceso de reorganización de las células. Por otra parte, estaría en consonancia con la naturaleza lenta del proceso migratorio inducido por HGF, ya que se piensa que la polarización del Golgi y de los microtúbulos juegan un papel más importante en células que presentan un tipo de migración lenta, mientras que las que se mueven rápidamente dependen más de la polimerización de actina (Yu et al. 2003). Teniendo en cuenta que la reorganización y polarización celular son eventos fundamentales de la respuesta morfogénica, estos procesos constituirían en sí mismos otra evidencia más en apoyo de la inducción de un programa morfogénico en células ovals por el HGF.

En definitiva, todos los fenómenos mencionados anteriormente, tanto el mantenimiento de la adhesión célula-célula como la ausencia de EMT y la inducción de reorganización y polarización celular en las colonias, apoyan la idea de que el HGF está induciendo la migración colectiva de las células ovals. La migración colectiva es importante durante el desarrollo, en los procesos de morfogénesis, durante la reparación tisular, para la migración de las láminas de células epiteliales a través de sustratos de matriz 2D y también puede constituir un mecanismo de invasión y metástasis en tumores (Friedl y Wolf. 2003; Friedl y Gilmour. 2009). El proceso migratorio que forma parte de la respuesta regenerativa hepática mediada por células ovals no

ha sido caracterizado aún, pero es factible pensar que los mismos mecanismos, por los que se ha propuesto que la migración colectiva puede ser ventajosa para la célula tumoral frente a la diseminación de células individuales, pueden operar en un contexto de reparación tisular: una mayor producción de factores autocrinos que promuevan la respuesta regenerativa, o de proteasas que faciliten la degradación de la matriz durante el remodelado tisular, así como la protección de las células internas del grupo frente al ataque de las células inflamatorias presentes en el tejido. No obstante, la capacidad migratoria de la célula oval es fundamental durante la respuesta regenerativa en la que participan estas células, pero también puede ser crítica tras la transformación neoplásica de las mismas para la posible invasión metastásica. Por tanto, este fenómeno podría contribuir de forma importante no sólo a regular la función pro-regenerativa de la célula oval, sino también su función pro-invasiva en un contexto tumoral.

### **La actividad pro-migratoria/pro-invasiva del HGF está mediada por PI3K, ERK-MAPKs, y p38-MAPKs**

El análisis sobre los mecanismos implicados en las actividades motogénica y pro-invasiva inducidas por HGF/Met en células ovals indica un papel crucial para la PI3K en la mediación de ambos procesos. Los experimentos realizados con inhibidores químicos específicos para esta quinasa (figuras 40-42), así como los experimentos de silenciamiento de la subunidad reguladora p85 mediante siRNAs específicos (figuras 44,45), demuestran que la inactivación de esta quinasa bloquea los efectos inducidos por HGF, tanto en los ensayos de migración/invasión a través de filtros cubiertos con matriz extracelular (*transwell* con colágeno IV o matrigel), como en los ensayos de migración dirigida al cierre de herida. Por el contrario, se han identificado funciones diferenciales para las ERK-MAPKs y p38-MAPK, de forma que las primeras son importantes para la migración/invasión a través de matrigel y el cierre de herida, mientras que p38-MAPK solo parece tener una función relevante en el proceso de migración/invasión a través de colágeno IV. Existen numerosos estudios sobre las señales que median específicamente las distintas actividades biológicas disparadas por HGF y su receptor Met. Usando quimeras de Met con cierta selectividad en la activación de la ruta de señalización de Ras-Raf-ERKs, e inhibidores de PI3K, se descubrió que la estimulación de Ras por sí sola es necesaria y suficiente para inducir proliferación y transformación celular, mientras que la estimulación de PI3K es suficiente para promover la dispersión celular (Royal y Park. 1995; Ponzetto et al. 1996). Sin embargo, Ras también ha sido implicada en la dispersión celular mediada por HGF. Así, Ras es importante para mediar la reorganización de actina, formación de “*ruffles*” en la membrana y la extensión celular, pero no es suficiente para inducir la respuesta completa (Ridley et al. 1995) y necesita activar otras señales, ERK1/2-MAPKs y PI3K, que son necesarias para el desensamblaje de las uniones adherentes durante el proceso de “*scattering*”



(Potempa y Ridley. 1998). De hecho, se ha visto que la cooperación entre ERK1/2-MAPKs y PI3K es crítica para que el HGF pueda inducir tanto “*scattering*” como tubulogénesis en células MDCK (Khawaja et al. 1998), así como para inducir la migración de fibroblastos (Delehedde et al. 2001), o la invasión de células de carcinoma hepatocelular, HepG2 (Lee et al. 2006) y de células de carcinoma de ovario (Ueoka et al. 2003; Zhou et al. 2007). Esto es interesante porque se ha visto que la activación de PI3K, en respuesta a la estimulación con HGF, puede verse potenciada por la activación de ERK1/2-MAPKs a través de la fosforilación de Gab1, lo que favorece la asociación Gab1/PI3K y la subsecuente fosforilación de PI3K (Yu et al. 2001). Estos datos establecen una dependencia funcional entre estas dos vías, que podría explicar la necesidad de al menos una actividad basal de ERK-MAPKs para la inducción de las respuestas al HGF en los modelos anteriormente descritos. Sin embargo, esta asociación funcional no opera siempre. Así, en progenitores neurales, la respuesta motogénica inducida por HGF es dependiente de PI3K, pero no de la vía de ERK1/2-MAPKs (Cacci et al. 2003). Curiosamente, a pesar de la distinta naturaleza del proceso migratorio inducido por HGF en células ovaes, nuestros resultados muestran que la ruta de señalización que media la respuesta del HGF en estas células comparte algunos aspectos claves con otros sistemas, como es la activación de la PI3K y de ERK1/2-MAPKs. Está por determinar si en nuestro sistema estas vías son mutuamente dependientes o no; así como definir cuál/es de los eventos que componen la respuesta migratoria/invasiva del HGF es/son regulado/s por cada una de estas vías.

En cuanto a la activación de p38-MAPK, aunque menos numerosos, hay estudios previos evidenciando también un papel para esta quinasa en la migración celular inducida por HGF. Así, la activación de p38-MAPK contribuye a la migración de células epiteliales de la córnea en respuesta a HGF (Sharma et al. 2003). En este sistema, las ERK-MAPKs y p38-MAPKs coordinarían conjuntamente los procesos de proliferación y migración durante la cicatrización de heridas, de forma que las ERK-MAPKs tendrían un papel fundamental para la proliferación celular y p38 para la migración celular. Por otra parte, se ha descrito que la activación concomitante de las vías de Ras/ERK, PI3K/AKT y Rac1/p38 es necesaria para alcanzar una capacidad migratoria máxima en neuronas corticales tratadas con HGF (Segarra et al. 2006). La explicación de por qué en células ovaes p38-MAPK jugaría un papel en la migración/invasión celular a través de colágeno IV, pero no a través de matrigel, ni tampoco en el cierre de herida, y la función concreta de p38-MAPK en ese contexto particular, no es obvia. No obstante, la naturaleza del sustrato es importante para modular la respuesta celular y existen evidencias previas en la literatura que apoyan esto. Así, la respuesta de dispersión celular inducida por HGF en células MDCK se ve favorecida al incrementar la concentración de matriz extracelular, es decir al aumentar la rigidez del sustrato, y es más eficiente sobre colágeno I y fibronectina que sobre laminina 1 (Rooij et al. 2005), lo cual está asociado a diferencias en la

organización del citoesqueleto de actina, la formación y estabilidad de los complejos cadherina-catenina, y la formación y recambio de las adhesiones focales mediadas por integrinas. También, resultados previos de nuestro laboratorio demostraban como el colágeno I estimula la proliferación de hepatocitos fetales, mientras que la fibronectina favorece la diferenciación celular (Sánchez et al. 2000). Se ha implicado a P38-MAPK en la inducción de MMP-1 y degradación de colágeno (Hecht et al. 2007), pero también en la inducción de la proliferación (Yao et al. 2004) mediados por HGF en osteoblastos y células madre hepáticas, respectivamente. Asimismo, se ha visto que p38-MAPK controla la migración celular modulando la organización del citoesqueleto de actina en distintos modelos celulares (Rousseau et al. 1997; Wang y Doerschuk. 2001; Pichon et al. 2004; Dreissigacke et al. 2006). El panorama es complejo y es evidente que se necesitan más experimentos para poder entender el papel concreto que juega cada una de las vías de señalización disparadas por HGF en el proceso migratorio/invasivo inducido por este factor en células ovas.

### **El HGF regula la expresión de genes relacionados con la unión célula-matriz y la remodelación de la matriz**

En concordancia con la actividad pro-motogénica y pro-invasiva del HGF en células ovas, nuestro trabajo muestra que el HGF regula la expresión de genes que codifican para proteínas que juegan un papel importante en la adhesión célula-matriz y en la remodelación de la matriz extracelular, destacando varias proteasas de la familia de las MMPs, así como integrinas y algunas proteínas de matriz extracelular, como colágeno o fibronectina (tabla I). Aunque estos datos no son suficientes para probar una implicación directa de estas proteínas en la respuesta migratoria e invasiva de las células, y mucho menos para conocer el papel específico que puedan tener, sí abre importantes perspectivas de estudio. En este sentido, la inducción de la expresión y actividad de metaloproteasas es un mecanismo fundamental en la morfogénesis de órganos, habiéndose demostrado su papel en el remodelado tisular durante la regeneración hepática (Olle et al. 2006). Además, la capacidad del HGF para activar proteasas de matriz extracelular es bien conocida y se ha asociado a su actividad pro-invasiva. En el contexto hepático, numerosos trabajos han descrito la capacidad del HGF de inducir un fenotipo invasivo en células de hepatoma, a través de la inducción de la expresión y actividad de MT1-MMP (Murakami et al. 1999), la inducción de la expresión de MMP-9 (Wang et al. 2007), o de uPA (Monvoisin et al. 1999). Asimismo, la activación transcripcional de MMP-7 tiene un papel fundamental en el “*scattering*” inducido por HGF en células HepG2, a través de la degradación de E-cadherina (Pan et al. 2010). Por otra parte, la neutralización de MMP-1 mediante anticuerpos disminuye significativamente el cierre de herida inducido por HGF en células epiteliales de córnea, mientras que la neutralización de MMP-9 lo aumenta (Daniels et al. 2003).

Estos datos, entre otros, evidencian que la implicación de diferentes proteasas y su función en la regulación de las respuestas inducidas por HGF son específicas del tipo celular y del contexto. Por último, no podemos olvidar que, además de su efecto clave sobre la remodelación de la matriz, otro papel conocido de las MMPs es la activación de factores de crecimiento y citoquinas. En este sentido, es interesante comentar resultados recientemente publicados en los que implican a la MMP-13 en la respuesta regenerativa durante la fibrosis/cirrosis hepática, gracias a su capacidad para promover la conversión de la forma precursora del HGF a su forma madura, e inducir la activación de MMP-2 y MMP-9 (Endo et al. 2011). Estudios futuros nos permitirán aclarar la relevancia de las MMPs en la respuesta particular de las células ovasales al HGF.

Algo más oscura es la relevancia biológica de la inducción de proteínas de matriz extracelular por HGF en células ovasales para los procesos de migración/invasión. De hecho, la acción antifibrótica otorgada al HGF en distintos tejidos, incluido el hígado, se ha ligado, entre otros mecanismos, a su capacidad para inhibir la síntesis de colágeno y su acumulación, a través de la inducción de metaloproteasas (Nakamura et al. 2005; Sherriff-Tadano et al. 2006; Xia et al. 2006). Por el contrario, también se ha descrito la capacidad del HGF para estimular la producción de varias proteínas de matriz, incluyendo fibronectina, colágeno  $\alpha 1$  (IV), laminina, ácido hialurónico y elastina, en distintos tipos celulares, como fibroblastos, células epiteliales renales y hepatocitos (Laping et al. 2000; Luo et al. 2006; Hoshiba et al. 2008).

La matriz extracelular podría modular la respuesta al HGF de las células ovasales. Así, se sabe que el HGF puede unirse a la matriz, habiéndose demostrado su unión a proteoglicanos heparán sulfato, y colágenos tipo I, III, IV, V y VI, siendo esta forma unida a matriz biológicamente activa, lo que se cree que puede ser importante para regular la disponibilidad y actividad del factor y por tanto para modular sus respuestas (Arakaki et al. 1992; Naka et al. 1994; Schuppan et al. 1998). Otra forma en la que la matriz extracelular puede modular la respuesta del HGF es a través de la señalización por integrinas. Es bien conocido que la colaboración entre factores de crecimiento y las integrinas modulan la señalización intracelular y por tanto regulan el comportamiento celular a través de la modulación de la señalización (Miyamoto et al. 1996). De hecho, la unión de HGF a fibronectina y vitronectina aumenta la migración de células endoteliales y lo hace promoviendo la asociación entre Met y las integrinas (Rahman et al. 2005). Una de las asociaciones más conocidas de Met con otro receptor es precisamente la integrina  $\alpha 6 \beta 4$ , que se fosforila en tirosina tras la activación de Met y potencia la activación mediada por HGF de las rutas de Ras y PI3K, de forma independiente de su unión a laminina (Trusolino et al. 2001). Además, HGF aumenta la expresión de la integrina  $\alpha 2 \beta 1$ , lo que es necesario para inducir el programa de tubulogénesis ramificada (Chiu et al. 2002) o para

aumentar la adhesión de células HepG2 a colágeno y aumentar su capacidad para atravesar la matriz (Kawakami-Kimura et al. 1997). Estas evidencias son más que suficientes para demostrar la contribución de todas estas moléculas a la señalización de HGF/Met y su papel en la regulación de la inducción de actividades biológicas específicas, quedando abierto el camino para analizar su papel concreto en las respuestas inducidas por esta vía de señalización en células ovas.

### **HGF: una señal que promueve la regeneración hepática mediada por células ovas**

El papel crucial que juega la ruta de señalización de HGF/Met en regeneración tisular está ampliamente establecido. En hígado, son muchos los modelos animales utilizados para apoyar este papel pro-regenerador del HGF, en los que se demuestra que el HGF y su receptor Met se inducen en respuesta a un daño (Kinoshita et al. 1989; Aldana et al. 1994; Miyazawa et al, 1994; Ho et al. 1999; Pediaditakis et al. 2001). Además, la administración de HGF atenúa de forma significativa la fibrosis/cirrosis y otros daños hepáticos (Kosai et al. 1999; Ueki et al. 1999; Phaneuf et al. 2000; Sasaki et al, 2006; Li et al, 2007). La demostración inequívoca de su papel crítico en regeneración la han proporcionado los modelos de ratón *knock-out* de Met, en concreto estudios realizados en ratones *knock-out* condicionales de Met específicos de hígado han demostrado que la inactivación de Met afecta de forma dramática a la respuesta adaptativa del hígado frente a un daño. Este fallo en la respuesta de reparación parece ser consecuencia no solo de un aumento de la apoptosis de los hepatocitos, sino también de un retraso en el proceso de cicatrización provocado por diversas alteraciones, entre otras, la incapacidad de los hepatocitos para migrar hacia las zonas dañadas (Hu et al, 2004). Estos resultados constituyen una sólida prueba de que el HGF juega un papel crítico en la remodelación tisular tras un daño y que su capacidad para promover la migración celular forma parte importante en este proceso. Estudios publicados muy recientemente parecen indicar que mecanismos similares podrían mediar el efecto pro-regenerador del HGF en la vía alternativa de regeneración hepática, es decir, la mediada por células madre/progenitoras hepáticas. Así, usando tanto ratones  $Met^{fl/fl}$ ,  $Mx1-Cre^{+/-}$  como  $Met^{fl/fl}$ ,  $Alb-Cre^{+/-}$  (los dos modelos animales disponibles de ratón *knock-out* condicional de Met específicos de hígado) se ha demostrado que la señalización a través de HGF/Met es también esencial para la regeneración hepática mediada por células madre/progenitoras (Ishikawa et al. 2011). En ausencia de Met se observa daño hepático severo, asociado a una profunda reducción de la capacidad de las células ovas para proliferar, diferenciar a hepatocitos y migrar al parénquima hepático, con las consecuentes alteraciones en el remodelado tisular. Nuestros datos estarían en perfecta consonancia con estas observaciones *in vivo* y constituyen evidencias directas de que el HGF promueve la migración de las células ovas y su reorganización, la polarización celular y la invasión a través de matriz extracelular.

Todos estos procesos, junto a la actividad antiapoptótica, demostrada previamente por nuestro grupo de investigación (del Castillo et al. 2008), son componentes fundamentales en cualquier respuesta morfogénica y regenerativa. Parece por tanto, que los fenómenos que observamos en las células ovals en cultivo en respuesta a tratamiento con HGF son un reflejo del programa de morfogénesis epitelial inducido por HGF en las células ovals *in vivo*, en un contexto de daño hepático que conduciría finalmente a la remodelación tisular y la reparación del daño, lo cual también se refleja en nuestro modelo a través de la capacidad del HGF para promover la cicatrización de herida. Hay que mencionar que otros autores han propuesto que el HGF podría promover la reparación y, más específicamente, el remodelado del tejido a través del reclutamiento de progenitores hematopoyéticos (Kollet et al. 2003; Asano et al. 2007). Si el HGF actúa sobre las células endógenas, exógenas, o ambas para llevar a cabo sus efectos, será objeto de discusión a lo largo de los próximos años. No obstante, nuestro trabajo aporta evidencias sólidas de sus efectos específicos sobre la población de células progenitoras adultas endógenas hepáticas.

Teniendo en cuenta la capacidad de las células ovals para transformarse (Pack et al. 1993; Dumble et al. 2004) y su posible asociación con el desarrollo de cáncer hepático (Sell. Y Leffert. 2008; Alison. 2006; Roskams. 2006), así como el posible papel oncogénico de HGF y Met durante el desarrollo y la invasión del carcinoma hepatocelular (Jiang et al. 2001; Daveau et al. 2003), es factible pensar que la ruta de señalización de HGF/Met pueda también promover la conversión maligna de las células ovals. Sustentando esta hipótesis, se encuentran las siguientes evidencias: i) las células progenitoras hepáticas espontáneamente transformadas presentan una activación autocrina de HGF/Met que promueve la proliferación autónoma de estas células (Presnell et al. 1998), ii) la ruta HGF/Met promueve el crecimiento y supervivencia de las células ovals, resultados que han sido obtenidos en nuestro laboratorio (del Castillo et al. 2008; Martínez-Palacián et al. 2012), y iii) la ruta HGF/Met tiene actividad pro-migratoria y pro-invasiva en células ovals, resultados presentados en esta memoria. Con todos estos datos y a falta de pruebas más directas, tomaría fuerza la todavía hipotética implicación de la vía HGF/Met en la malignización de células ovals.

En conclusión, los resultados presentados en esta memoria aportan evidencias claras que apoyan un papel crítico para la vía de señalización de HGF/Met en el proceso de expansión de las células ovals en el hígado en respuesta a daño y, por tanto, en la regeneración hepática mediada por estas células. Además, abre nuevas perspectivas de futuro sobre el posible papel de la vía HGF/Met en la transformación oncogénica de estas células y su implicación en el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

## **VI. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. El HGF promueve la migración celular pero no la dispersión celular o “*scattering*” de células ovas *in vitro*. Por el contrario, el proceso migratorio inducido por el HGF conduce al agrupamiento y organización de estas células en hileras.
2. El HGF favorece la migración *in vitro* de células ovas dirigida al cierre de herida; así como a la migración e invasión celular a través de proteínas de matriz extracelular (colágeno IV y matrigel).
3. Tanto el proceso migratorio que conduce al agrupamiento y reorganización celular, como los procesos de migración/invasión a través de matriz extracelular y la migración dirigida al cierre de herida, inducidos por HGF en células ovas *in vitro*, requieren la activación y señalización intacta a través de su receptor c-Met, ya que dichos procesos se ven anulados en células Met<sup>-/-</sup>, que carecen de actividad tirosina quinasa de c-Met.
4. El proceso migratorio inducido por el HGF en células ovas *in vitro* va acompañado de cambios en la organización del citoesqueleto de actina, así como la activación e internalización de ZO-1, pero no se produce pérdida de expresión de ZO-1 o de otras proteínas implicadas en la adhesión célula-célula (occludina, E-cadherina).
5. El proceso migratorio inducido por HGF en células ovas *in vitro* no está asociado a un proceso de EMT, lo que se evidencia por la incapacidad del HGF para inducir la expresión de Snail y disminuir la expresión de E-cadherina.
6. El HGF promueve la compactación y polarización del aparato de Golgi en células ovas *in vitro*, indicativo de la polarización celular durante el proceso migratorio.
7. En hepatocitos neonatales *in vitro*, el HGF tiene un efecto pro-migratorio/pro-invasivo, que tampoco está asociado a “*scattering*”, ni conlleva EMT, pero que presenta algunas diferencias con el proceso observado en células ovas. En estas células, no se observa una organización celular específica, no hay internalización de ZO-1, ni compactación/polarización del aparato de Golgi.
8. La activación de la ruta de PI3K juega un papel crítico en el proceso migratorio/invasivo inducido por el HGF en células ovas, ya que la inhibición de su activación anula la capacidad del HGF para inducir la migración/invasión de las células a través de colágeno IV y matrigel, así como la migración dirigida al cierre de herida.
9. Las rutas de ERK1/2-MAPKs y p38-MAPK tienen un efecto diferencial sobre los procesos de migración/invasión *in vitro* inducidos por HGF en células ovas. Así, la activación de p38-MAPK solo es importante para promover la migración/invasión a través de colágeno IV, mientras que la activación de ERK1/2-MAPKs parece ser necesaria tanto para la migración/invasión a través de matrigel, como para el cierre de herida.



10. La respuesta pro-migratoria/pro-invasiva inducida por HGF en células ovas *in vitro* está asociada a la inducción de la expresión de genes que codifican para proteínas con un papel clave en la interacción célula-matriz y en la remodelación de la matriz extracelular, entre ellas, proteínas de la familia de las integrinas, metaloproteasas y proteínas de matriz extracelular, como el colágeno.

### **Conclusión final.**

El presente trabajo ha abordado el estudio del papel de la ruta HGF/c-Met en las propiedades migratorias e invasivas de las células ovas, o progenitoras adultas hepáticas. Nuestros resultados indican que el HGF, a través de su receptor c-Met induce un proceso de migración en grupo, conducente a la reorganización celular en hileras, proceso que parece emular el de morfogénesis que sufren estas células *in vivo*. Asimismo, el HGF favorece la migración/invasión celular a través de matriz y la cicatrización *in vitro*, procesos en los que la activación de PI3K juega un papel fundamental.

## **VII. BIBLIOGRAFIA**



- . 2003b. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (3):225-236.
- Acloque, H., M. S. Adams, et al.** (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease." *J Clin Invest* 119(6): 1438-49.
- Akhurst, B., E. J. Croager, et al.** (2001). "A modified choline-deficient, ethionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver." *Hepatology* 34(3): 519-22.
- Albini, A. and D. M. Noonan** "The 'chemoinvasion' assay, 25 years and still going strong: the use of reconstituted basement membranes to study cell invasion and angiogenesis." *Curr Opin Cell Biol* 22(5): 677-89.
- Apte, U., M. D. Thompson, et al.** (2008). "Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents." *Hepatology* 47(1): 288-95.
- Apte, U., M. D. Thompson, S. Cui, B. Liu, B. Cieply, and S. P. Monga.** 2008. Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents. *Hepatology* 47 (1):288-295.
- Balda, M. S. and K. Matter** (1998). "Tight junctions." *J Cell Sci* 111 ( Pt 5): 541-7.
- Bardelli, A., C. Ponzetto, et al.** (1994). "Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering." *J Biotechnol* 37(2): 109-22.
- Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto** (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." *Development* 132(14): 3151-61.
- Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, and A. Garcia De Herreros.** 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2 (2):84-89.
- Bauer, H., J. Zweimueller-Mayer, et al.** (2010) "The dual role of zonula occludens (ZO) proteins." *J Biomed Biotechnol* : 402593.
- Bennett, N. T. and G. S. Schultz** (1993). "Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors." *Am J Surg* 165(6): 728-37.
- Benvenuti, S. and P. M. Comoglio** (2007). "The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis." *J Cell Physiol* 213(2): 316-25.
- Benvenuti, S., and P. M. Comoglio.** 2007. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J Cell Physiol* 213 (2):316-325.
- Bertotti, A. and P. M. Comoglio** (2003). "Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor." *Trends Biochem Sci* 28(10): 527-33.
- Bevan, D., E. Gherardi, et al.** (2004). "Diverse and potent activities of HGF/SF in skin wound repair." *J Pathol* 203(3): 831-8.
- Birchmeier, C. and E. Gherardi** (1998). "Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase." *Trends Cell Biol* 8(10): 404-10.

- Birchmeier, C., W. Birchmeier, et al.** (2003). "Met, metastasis, motility and more." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(12): 915-25.
- Bladt, F., D. Riethmacher, et al.** (1995). "Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud." Nature **376**(6543): 768-71.
- Blanco, M. J., G. Moreno-Bueno, et al.** (2002). "Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas." Oncogene **21**(20): 3241-6.
- Blanquaert, F., D. Barritault, et al.** (1999). "Effects of heparan-like polymers associated with growth factors on osteoblast proliferation and phenotype expression." J Biomed Mater Res **44**(1): 63-72.
- Boccaccio, C. and P. M. Comoglio** (2006). "Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells." Nat Rev Cancer **6**(8): 637-45.
- Boccaccio, C., G. Gaudino, et al.** (1994). "Hepatocyte growth factor (HGF) receptor expression is inducible and is part of the delayed-early response to HGF." J Biol Chem **269**(17): 12846-51.
- Boccaccio, C., M. Ando, et al.** (1998). "Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway." Nature **391**(6664): 285-8.
- Bolos, V., H. Peinado, et al.** (2003). "The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors." J Cell Sci **116**(Pt 3): 499-511.
- Bonifacino, J. S. and R. Rojas** (2006). "Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(8): 568-79.
- Borowiak, M., A. N. Garratt, et al.** (2004). "Met provides essential signals for liver regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(29): 10608-13.
- Bottaro, D. P., J. S. Rubin, et al.** (1991). "Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product." Science **251**(4995): 802-4.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brand-Saberi, B., T. S. Muller, et al.** (1996). "Scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF) induces emigration of myogenic cells at interlimb level in vivo." Dev Biol **179**(1): 303-8.
- Buccione, R., G. Caldieri, et al.** (2009). "Invadopodia: specialized tumor cell structures for the focal degradation of the extracellular matrix." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 137-49.
- Burdsal, C. A., C. H. Damsky, et al.** (1993). "The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak." Development **118**(3): 829-44.
- Burns, A. R., R. A. Bowden, et al.** (2000). "Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration." J Cell Sci **113** ( Pt 1): 45-57.

- Caja, L., C. Ortiz, et al.** (2007). "Differential intracellular signalling induced by TGF-beta in rat adult hepatocytes and hepatoma cells: implications in liver carcinogenesis." *Cell Signal* **19**(4): 683-94.
- Cano, A., M. A. Perez-Moreno, et al.** (2000). "The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression." *Nat Cell Biol* **2**(2): 76-83.
- Cano, A., M. A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M. J. Blanco, M. G. del Barrio, F. Portillo, and M. A. Nieto.** 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* **2** (2):76-83.
- Carman, C. V.** (2009). "Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'." *J Cell Sci* **122**(Pt 17): 3025-35.
- Carmona-Fontaine, C., H. K. Matthews, et al.** (2008). "Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration." *Nature* **456**(7224): 957-61.
- Chang, L. and M. Karin** (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature* **410**(6824): 37-40.
- Charras, G. and E. Paluch** (2008). "Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(9): 730-6.
- Chen, W. T.** (1989). "Proteolytic activity of specialized surface protrusions formed at rosette contact sites of transformed cells." *J Exp Zool* **251**(2): 167-85.
- Cheng, G. Z., J. Chan, et al.** (2007). "Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel." *Cancer Res* **67**(5): 1979-87.
- Coltella, N., A. Rasola, et al.** (2006). "p38 MAPK turns hepatocyte growth factor to a death signal that commits ovarian cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis." *Int J Cancer* **118**(12): 2981-90.
- Comoglio, P. M.** (1993). "Structure, biosynthesis and biochemical properties of the HGF receptor in normal and malignant cells." *EXS* **65**: 131-65.
- Comoglio, P. M.** (2001). "Pathway specificity for Met signalling." *Nat Cell Biol* **3**(7): E161-2.
- Comoglio, P. M. and L. Trusolino** (2002). "Invasive growth: from development to metastasis." *J Clin Invest* **109**(7): 857-62.
- Conway, K., P. Price, et al.** (2006). "The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing." *Wound Repair Regen* **14**(1): 2-10.
- Cooper, C. S., M. Park, et al.** (1984). "Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line." *Nature* **311**(5981): 29-33.
- Crosby, H. A., S. Hubscher, et al.** (1998). "Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6." *Am J Pathol* **152**(3): 771-9.

- De Wever, O., P. Pauwels, et al.** (2008). "Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front." Histochem Cell Biol **130**(3): 481-94.
- del Castillo, G., V. M. Factor, et al.** (2008). "Deletion of the Met tyrosine kinase in liver progenitor oval cells increases sensitivity to apoptosis in vitro." Am J Pathol **172**(5): 1238-47.
- Denker, B. M. and S. K. Nigam** (1998). "Molecular structure and assembly of the tight junction." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): F1-9.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, et al.** (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." Oncogene **26**(22): 3279-90.
- Diz-Munoz, A., M. Krieg, et al.** "Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment." PLoS Biol **8**(11): e1000544.
- Dumble, M. L., E. J. Croager, et al.** (2002). "Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma." Carcinogenesis **23**(3): 435-45.
- Eilken, H. M. and R. H. Adams** "Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis." Curr Opin Cell Biol **22**(5): 617-25.
- Etienne-Manneville, S.** (2004). "Cdc42--the centre of polarity." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1291-300.
- Evarts, R. P., P. Nagy, et al.** (1987). "A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver." Carcinogenesis **8**(11): 1737-40.
- Ewald, A. J., A. Brenot, et al.** (2008). "Collective epithelial migration and cell rearrangements drive mammary branching morphogenesis." Dev Cell **14**(4): 570-81.
- Fabregat, I., C. de Juan, et al.** (1992). "Growth stimulation of rat fetal hepatocytes in response to hepatocyte growth factor: modulation of c-myc and c-fos expression." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 684-90.
- Fabregat, I., M. Lorenzo, et al.** (1989). "Precocious induction of malic enzyme by nutritional and hormonal factors in rat foetal hepatocyte primary cultures." Biochem Biophys Res Commun **161**(3): 1028-34.
- Fackler, O. T. and R. Grosse** (2008). "Cell motility through plasma membrane blebbing." J Cell Biol **181**(6): 879-84.
- Fan, S., M. Gao, et al.** (2005). "Role of NF-kappaB signaling in hepatocyte growth factor/scatter factor-mediated cell protection." Oncogene **24**(10): 1749-66.
- Fang, C. H., J. Q. Gong, et al.** (2004). "Function of oval cells in hepatocellular carcinoma in rats." World J Gastroenterol **10**(17): 2482-7.
- Fanning, A. S., B. J. Jameson, et al.** (1998). "The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton." J Biol Chem **273**(45): 29745-53.
- Farber, E.** (1956). "Carcinoma of the liver in rats fed ethionine." AMA Arch Pathol **62**(6): 445-53.

- Farooqui, R. and G. Fenteany** (2005). "Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement." J Cell Sci **118**(Pt 1): 51-63.
- Fausto, N.** (2000). "Liver regeneration." J Hepatol **32**(1 Suppl): 19-31.
- Fausto, N. and J. S. Campbell** (2003). "The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation." Mech Dev **120**(1): 117-30.
- Ferracini, R., P. Longati, et al.** (1991). "Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase." J Biol Chem **266**(29): 19558-64.
- Flanders, K. C.** (2004). "Smad3 as a mediator of the fibrotic response." Int J Exp Pathol **85**(2): 47-64.
- Friedl, P. and D. Gilmour** (2009). "Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(7): 445-57.
- Friedl, P. and K. Wolf** (2008). "Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion." Cancer Res **68**(18): 7247-9.
- Friedl, P., and D. Gilmour.** 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. Nat Rev Mol Cell Biol **10** (7):445-457.
- Friedl, P., Y. Hegerfeldt, and M. Tusch.** 2004. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. Int J Dev Biol **48** (5-6):441-449.
- Fuchs, B. C., T. Fujii, et al.** (2008). "Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells." Cancer Res **68**(7): 2391-9.
- Furge, K. A., Y. W. Zhang, et al.** (2000). "Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins." Oncogene **19**(49): 5582-9.
- Furuse, M.** (2010)"Molecular basis of the core structure of tight junctions." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(1): a 002907.
- Gambarotta, G., S. Pistoi, et al.** (1994). "Structure and inducible regulation of the human MET promoter." J Biol Chem **269**(17): 12852-7.
- Gandino, L., P. Longati, et al.** (1994). "Phosphorylation of serine 985 negatively regulates the hepatocyte growth factor receptor kinase." J Biol Chem **269**(3): 1815-20.
- Gao, C. F. and G. F. Vande Woude** (2005). "HGF/SF-Met signaling in tumor progression." Cell Res **15**(1): 49-51.
- Gaudino, G., A. Follenzi, et al.** (1994). "RON is a heterodimeric tyrosine kinase receptor activated by the HGF homologue MSP." EMBO J **13**(15): 3524-32.
- Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev** (2008). "Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors." Trends Mol Med **14**(5): 199-209.



- Gherardi, E., J. Gray, et al.** (1989). "Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(15): 5844-8.
- Gherardi, E., R. Gonzalez Manzano, et al.** (1997). "Evolution of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP)." *Ciba Found Symp* 212: 24-35; discussion 35-41, 42-5.
- Godde, N. J., R. C. Galea, et al.** (2010) "Cell polarity in motion: redefining mammary tissue organization through EMT and cell polarity transitions." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15(2): 149-68.
- Gohda, E., T. Matsunaga, et al.** (1994). "Induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by epidermal growth factor, platelet-derived growth factor and fibroblast growth factor." *Cytokine* 6(6): 633-40.
- Graff, J. R., E. Gabrielson, H. Fujii, S. B. Baylin, and J. G. Herman.** 2000. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem* 275 (4):2727-2732.
- Grant, D. S., H. K. Kleinman, et al.** (1993). "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(5): 1937-41.
- Grisham, J. W.** (1983). "Cell types in rat liver cultures: their identification and isolation." *Mol Cell Biochem* 53-54(1-2): 23-33.
- Grompe, M.** (2005). "The origin of hepatocytes." *Gastroenterology* 128(7): 2158-60.
- Grotegut, S., D. von Schweinitz, et al.** (2006). "Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail." *EMBO J* 25(15): 3534-45.
- Grunert, S., M. Jechlinger, et al.** (2003). "Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(8): 657-65.
- Gu, H. and B. G. Neel** (2003). "The "Gab" in signal transduction." *Trends Cell Biol* 13(3): 122-30.
- Gupton, S. L. and F. B. Gertler** (2007). "Filopodia: the fingers that do the walking." *Sci STKE* 2007(400): re5.
- Hammond, D. E., S. Urbe, et al.** (2001). "Down-regulation of MET, the receptor for hepatocyte growth factor." *Oncogene* 20(22): 2761-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg** (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Haraguchi, N., H. Ishii, et al.** (2010) "CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells." *J Clin Invest* 120(9): 3326-39.
- Hartmann, G., T. Prospero, et al.** (1998). "Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo." *Curr Biol* 8(3): 125-34.
- Hollande, F., E. M. Blanc, et al.** (2001). "HGF regulates tight junctions in new nontumorigenic gastric epithelial cell line." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(5): G910-21.

- Horiguchi, N., H. Takayama, et al.** (2002). "Hepatocyte growth factor promotes hepatocarcinogenesis through c-Met autocrine activation and enhanced angiogenesis in transgenic mice treated with diethylnitrosamine." *Oncogene* **21**(12): 1791-9.
- Hu, M., M. Kurobe, et al.** (2007). "Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells." *Gastroenterology* **133**(5): 1579-91.
- Hu, M., M. Kurobe, Y. J. Jeong, C. Fuerer, S. Ghole, R. Nusse, and K. G. Sylvester.** 2007. Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells. *Gastroenterology* **133** (5):1579-1591.
- Hu, Z., R. P. Evarts, et al.** (1993). "Expression of hepatocyte growth factor and c-met genes during hepatic differentiation and liver development in the rat." *Am J Pathol* **142**(6): 1823-30.
- Huber, M. A., N. Kraut, and H. Beug.** 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* **17** (5):548-558.
- Huff, J. L., M. A. Jelinek, et al.** (1993). "The protooncogene c-sea encodes a transmembrane protein-tyrosine kinase related to the Met/hepatocyte growth factor/scatter factor receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6140-4.
- Hugo, H., M. L. Ackland, et al.** (2007). "Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression." *J Cell Physiol* **213**(2): 374-83.
- Huh, C. G., V. M. Factor, et al.** (2004). "Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4477-82.
- Itoh, T., Y. Kamiya, et al.** (2009). "Inducible expression of Wnt genes during adult hepatic stem/progenitor cell response." *FEBS Lett* **583**(4): 777-81.
- Iwano, M., D. Plieth, et al.** (2002). "Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis." *J Clin Invest* **110**(3): 341-50.
- Jakubowski, A., C. Ambrose, et al.** (2005). "TWEAK induces liver progenitor cell proliferation." *J Clin Invest* **115**(9): 2330-40.
- Janetopoulos, C., L. Ma, et al.** (2004). "Chemoattractant-induced phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate accumulation is spatially amplified and adapts, independent of the actin cytoskeleton." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(24): 8951-6.
- Jiang, W. G. and K. G. Harding** (1998). "Enhancement of wound tissue expansion and angiogenesis by matrix-embedded fibroblast (dermagraft), a role of hepatocyte growth factor/scatter factor." *Int J Mol Med* **2**(2): 203-210.
- Jiang, W., S. Hiscox, K. Matsumoto, and T. Nakamura.** 1999. Hepatocyte growth factor/scatter factor, its molecular, cellular and clinical implications in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **29** (3):209-248.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat** (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-2.

- Johnson, M., G. Koukoulis, et al.** (1993). "Hepatocyte growth factor induces proliferation and morphogenesis in nonparenchymal epithelial liver cells." Hepatology **17**(6): 1052-61.
- Jungermann, K. and T. Kietzmann** (2000). "Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver." Hepatology **31**(2): 255-60.
- Kalluri, R.** (2009). "EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells." J Clin Invest **119**(6): 1417-9.
- Kalluri, R. and E. G. Neilson** (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis." J Clin Invest **112**(12): 1776-84.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg** (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-8.
- Kametani, Y. and M. Takeichi** (2007). "Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions." Nat Cell Biol **9**(1): 92-8.
- Kano, J., T. Ishiyama, et al.** (2008). "Differentially expressed genes in a porcine adult hepatic stem-like cell line and their expression in developing and regenerating liver." Lab Invest **88**(2): 132-43.
- Karihaloo, A., C. Nickel, et al.** (2005). "Signals which build a tubule." Nephron Exp Nephrol **100**(1): e40-5.
- Karin, M., Y. Cao, et al.** (2002). "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit." Nat Rev Cancer **2**(4): 301-10.
- Kataoka, H. and M. Kawaguchi** (2010). "Hepatocyte growth factor activator (HGFA): pathophysiological functions in vivo." FEBS J **277**(10): 2230-7.
- Knight, B., V. B. Matthews, et al.** (2005). "Jekyll and Hyde: evolving perspectives on the function and potential of the adult liver progenitor (oval) cell." Bioessays **27**(11): 1192-202.
- Kosai, K., K. Matsumoto, et al.** (1998). "Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor." Biochem Biophys Res Commun **244**(3): 683-90.
- Kosai, K., K. Matsumoto, et al.** (1999). "Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice." Hepatology **30**(1): 151-9.
- LaGamba, D., A. Nawshad, et al.** (2005). "Microarray analysis of gene expression during epithelial-mesenchymal transformation." Dev Dyn **234**(1): 132-42.
- Lee, J. S., J. Heo, et al.** (2006). "A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells." Nat Med **12**(4): 410-6.
- Lee, S. L., R. B. Dickson, et al.** (2000). "Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease." J Biol Chem **275**(47): 36720-5.
- Li, N., M. Lorinczi, et al.** (2007). "Specific Grb2-mediated interactions regulate clathrin-dependent endocytosis of the cMet-tyrosine kinase." J Biol Chem **282**(23): 16764-75.

- Libbrecht, L. and T. Roskams** (2002). "Hepatic progenitor cells in human liver diseases." Semin Cell Dev Biol **13**(6): 389-96.
- Longati, P., A. Bardelli, et al.** (1994). "Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor)." Oncogene **9**(1): 49-57.
- Ma, P. C., G. Maulik, et al.** (2003). "c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition." Cancer Metastasis Rev **22**(4): 309-25.
- Maina, F., F. Casagrande, et al.** (1996). "Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development." Cell **87**(3): 531-42.
- Maina, F., G. Pante, et al.** (2001). "Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes." Mol Cell **7**(6): 1293-306.
- Maina, F., M. C. Hilton, et al.** (1998). "Multiple roles for hepatocyte growth factor in sympathetic neuron development." Neuron **20**(5): 835-46.
- Mak, H. H., P. Peschard, et al.** (2007). "Oncogenic activation of the Met receptor tyrosine kinase fusion protein, Tpr-Met, involves exclusion from the endocytic degradative pathway." Oncogene **26**(51): 7213-21.
- Malarkey, D. E., K. Johnson, et al.** (2005). "New insights into functional aspects of liver morphology." Toxicol Pathol **33**(1): 27-34.
- Malik, R., C. Selden, et al.** (2002). "The role of non-parenchymal cells in liver growth." Semin Cell Dev Biol **13**(6): 425-31.
- Maroun, C. R., M. A. Naujokas, et al.** (2000). "The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase." Mol Cell Biol **20**(22): 8513-25.
- Mars, W. M., R. Zarnegar, et al.** (1993). "Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA." Am J Pathol **143**(3): 949-58.
- Martin, P.** (1997). "Wound healing--aiming for perfect skin regeneration." Science **276**(5309): 75-81.
- Matsumoto, K. and T. Nakamura** (1996). "Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor." J Biochem **119**(4): 591-600.
- Matsumoto, K. and T. Nakamura** (2006). "Hepatocyte growth factor and the Met system as a mediator of tumor-stromal interactions." Int J Cancer **119**(3): 477-83.
- Matsumoto, K., H. Kataoka, et al.** (1998). "Cooperative interaction between alpha- and beta-chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses." J Biol Chem **273**(36): 22913-20.
- Matsumoto, K., H. Okazaki, et al.** (1995). "Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration." J Biochem **117**(2): 458-64.

- Matsumoto, K., H. Tajima, et al.** (1991). "Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth." Biochem Biophys Res Commun **176**(1): 45-51.
- Matsumoto, K., H. Tajima, et al.** (1992). "Negative regulation of hepatocyte growth factor gene expression in human lung fibroblasts and leukemic cells by transforming growth factor-beta 1 and glucocorticoids." J Biol Chem **267**(35): 24917-20.
- Matsumoto, K., H. Tajima, et al.** (1993). "Heparin as an inducer of hepatocyte growth factor." J Biochem **114**(6): 820-6.
- Matter, K., and M. S. Balda.** 2003a. Functional analysis of tight junctions. Methods **30**(3):228-234.
- Matthews, V. B. and G. C. Yeoh** (2005). "Liver stem cells." IUBMB Life **57**(8): 549-53.
- Maulik, G., T. Kijima, et al.** (2002). "Modulation of the c-Met/hepatocyte growth factor pathway in small cell lung cancer." Clin Cancer Res **8**(2): 620-7.
- Mayor, R. and C. Carmona-Fontaine** (2010)"Keeping in touch with contact inhibition of locomotion." Trends Cell Biol **20**(6): 319-28.
- Michalopoulos, G. K.** (2007). "Liver regeneration." J Cell Physiol **213**(2): 286-300.
- Michalopoulos, G. K.** (2010) "Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas." Am J Pathol **176**(1): 2-13.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances** (1997). "Liver regeneration." Science **276**(5309): 60-6.
- Michalopoulos, G. K., L. Barua, et al.** (2005). "Transdifferentiation of rat hepatocytes into biliary cells after bile duct ligation and toxic biliary injury." Hepatology **41**(3): 535-44.
- Miyazawa, K.** (2010) "Hepatocyte growth factor activator (HGFA): a serine protease that links tissue injury to activation of hepatocyte growth factor." FEBS J **277**(10): 2208-14.
- Miyazawa, K., T. Shimomura, et al.** (1993). "Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII." J Biol Chem **268**(14): 10024-8.
- Mizuno, K. and T. Nakamura** (1993). "Molecular characteristics of HGF and the gene, and its biochemical aspects." EXS **65**: 1-29.
- Moghul, A., L. Lin, et al.** (1994). "Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript." Oncogene **9**(7): 2045-52.
- Montagner, A., A. Yart, et al.** (2005). "A novel role for Gab1 and SHP2 in epidermal growth factor-induced Ras activation." J Biol Chem **280**(7): 5350-60.
- Montell, D. J.** (2008). "Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties." Science **322**(5907): 1502-5.

- Montesano, R., K. Matsumoto, et al.** (1991). "Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor." Cell **67**(5): 901-8.
- Mosesson, Y., G. B. Mills, et al.** (2008). "Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer." Nat Rev Cancer **8**(11): 835-50.
- Moumen, A., A. Ieraci, et al.** (2007). "Met signals hepatocyte survival by preventing Fas-triggered FLIP degradation in a PI3k-Akt-dependent manner." Hepatology **45**(5): 1210-7.
- Muller, M., A. Morotti, et al.** (2002). "Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis." Mol Cell Biol **22**(4): 1060-72.
- Nagy, P., H. C. Bisgaard, et al.** (1996). "In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2-acetylaminofluorene." Hepatology **23**(1): 71-9.
- Nakamura, T.** (1991). "Structure and function of hepatocyte growth factor." Prog Growth Factor Res **3**(1): 67-85.
- Nakamura, T. and S. Mizuno** (2010) "The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(6): 588-610.
- Nakamura, T., K. Nawa, et al.** (1984). "Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats." Biochem Biophys Res Commun **122**(3): 1450-9.
- Nakamura, T., K. Sakai, et al.** "Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor." J Gastroenterol Hepatol **26 Suppl 1**: 188-202.
- Nakamura, T., T. Nishizawa, et al.** (1989). "Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor." Nature **342**(6248): 440-3.
- Naldini, L., E. Vigna, et al.** (1991). "The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation." Mol Cell Biol **11**(4): 1793-803.
- Naldini, L., K. M. Weidner, et al.** (1991). "Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor." EMBO J **10**(10): 2867-78.
- Naldini, L., L. Tamagnone, et al.** (1992). "Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor." EMBO J **11**(13): 4825-33.
- Nath, D., N. J. Williamson, et al.** (2001). "Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase." J Cell Sci **114**(Pt 6): 1213-20.
- Neilson, E. G.** (2005). "Setting a trap for tissue fibrosis." Nat Med **11**(4): 373-4.
- Newsome, P. N., M. A. Hussain, et al.** (2004). "Hepatic oval cells: helping redefine a paradigm in stem cell biology." Curr Top Dev Biol **61**: 1-28.
- Niessen, C. M.** (2007). "Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function." J Invest Dermatol **127**(11): 2525-32.

- Nieto, M. A.** (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3): 155-66.
- Nobes, C. D. and A. Hall** (1995). "Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia." *Cell* 81(1): 53-62.
- Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, et al.** (1993). "Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice." *Nature* 364(6440): 806-9.
- Okabe, M., Y. Tsukahara, et al.** (2009). "Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver." *Development* 136(11): 1951-60.
- Okano, J., G. Shiota, et al.** (2003). "Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 309(2): 298-304.
- Omary, M. B., P. A. Coulombe, et al.** (2004). "Intermediate filament proteins and their associated diseases." *N Engl J Med* 351(20): 2087-100.
- Onder, T. T., P. B. Gupta, et al.** (2008). "Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways." *Cancer Res* 68(10): 3645-54.
- Overturf, K., M. al-Dhalimy, et al.** (1997). "Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes." *Am J Pathol* 151(5): 1273-80.
- Pack, R., R. Heck, et al.** (1993). "Isolation, biochemical characterization, long-term culture, and phenotype modulation of oval cells from carcinogen-fed rats." *Exp Cell Res* 204(2): 198-209.
- Paku, S., J. Schnur, et al.** (2001). "Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver." *Am J Pathol* 158(4): 1313-23.
- Park, M., M. Dean, et al.** (1986). "Mechanism of met oncogene activation." *Cell* 45(6): 895-904.
- Park, M., M. Dean, et al.** (1987). "Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(18): 6379-83.
- Pennacchietti, S., P. Michieli, et al.** (2003). "Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene." *Cancer Cell* 3(4): 347-61.
- Peruzzi, B. and D. P. Bottaro** (2006). "Targeting the c-Met signaling pathway in cancer." *Clin Cancer Res* 12(12): 3657-60.
- Peschard, P., T. M. Fournier, et al.** (2001). "Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein." *Mol Cell* 8(5): 995-1004.
- Petersen, B. E., J. P. Goff, et al.** (1998). "Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat." *Hepatology* 27(2): 433-45.

**Petrelli, A., G. F. Gilestro, et al.** (2002). "The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met." Nature **416**(6877): 187-90.

**Phaneuf, D., A. D. Moscioni, et al.** (2004). "Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: demonstration of impaired liver regeneration." DNA Cell Biol **23**(9): 592-603.

**Phaneuf, D., S. J. Chen, et al.** (2000). "Intravenous injection of an adenovirus encoding hepatocyte growth factor results in liver growth and has a protective effect against apoptosis." Mol Med **6**(2): 96-103.

**Pijnenborg, R., G. Dixon, et al.** (1980). "Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy." Placenta **1**(1): 3-19.

**Pollack, A. L., G. Apodaca, and K. E. Mostov.** 2004. Hepatocyte growth factor induces MDCK cell morphogenesis without causing loss of tight junction functional integrity. Am J Physiol Cell Physiol **286** (3):C482-494.

**Ponzetto, C., A. Bardelli, et al.** (1994). "A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family." Cell **77**(2): 261-71.

**Preisegger, K. H., V. M. Factor, et al.** (1999). "Atypical ductular proliferation and its inhibition by transforming growth factor beta1 in the 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine mouse model for chronic alcoholic liver disease." Lab Invest **79**(2): 103-9.

**Preisinger, C., B. Short, et al.** (2004). "YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta." J Cell Biol **164**(7): 1009-20.

**Raiborg, C., T. E. Rusten, et al.** (2003). "Protein sorting into multivesicular endosomes." Curr Opin Cell Biol **15**(4): 446-55.

**Revenu, C., and D. Gilmour.** 2009. EMT 2.0: shaping epithelia through collective migration. Curr Opin Genet Dev **19** (4):338-342.

**Ridley, A. J.** (2010) "Life at the leading edge." Cell **145**(7): 1012-22.

**Ridley, A. J., M. A. Schwartz, et al.** (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-9.

**Rodriguez-Boulán, E. and W. J. Nelson** (1989). "Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype." Science **245**(4919): 718-25.

**Rodriguez-Pena, J. M., C. Rodriguez, et al.** (2002). "Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites." J Cell Sci **115**(Pt 12): 2549-58.

**Ronsin, C., F. Muscatelli, et al.** (1993). "A novel putative receptor protein tyrosine kinase of the met family." Oncogene **8**(5): 1195-202.

**Rosario, M. and W. Birchmeier** (2003). "How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase." Trends Cell Biol **13**(6): 328-35.



- Rosario, M. and W. Birchmeier** (2004). "Making tubes: step by step." Dev Cell **7**(1): 3-5.
- Rosen, E. M., L. Meromsky, et al.** (1990). "Purified scatter factor stimulates epithelial and vascular endothelial cell migration." Proc Soc Exp Biol Med **195**(1): 34-43.
- Roskams, T.** (2006). "Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma." Oncogene **25**(27): 3818-22.
- Roskams, T., S. Q. Yang, et al.** (2003). "Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease." Am J Pathol **163**(4): 1301-11.
- Russell, W. E., J. A. McGowan, et al.** (1984). "Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets." J Cell Physiol **119**(2): 183-92.
- Sanchez, A. and I. Fabregat** (2009). "Genetically modified animal models recapitulating molecular events altered in human hepatocarcinogenesis." Clin Transl Oncol **11**(4): 208-14.
- Sandgren, E. P., R. D. Palmiter, et al.** (1991). "Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene." Cell **66**(2): 245-56.
- Santoni-Rugiu, E., P. Jenes, et al.** (2005). "Progenitor cells in liver regeneration: molecular responses controlling their activation and expansion." APMIS **113**(11-12): 876-902.
- Sarraf, C., E. N. Lalani, M. Golding, T. V. Anilkumar, R. Poulson, and M. Alison.** 1994. Cell behavior in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. Light and electron microscopic observations. Am J Pathol **145** (5):1114-1126.
- Schaeper, U., N. H. Gehring, et al.** (2000). "Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses." J Cell Biol **149**(7): 1419-32.
- Schafer, M. and S. Werner** (2008). "Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 628-38.
- Schelter, F., J. Kobuch, et al.** (2010)"A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor." J Biol Chem **285**(34): 26335-40.
- Schmidt, C., F. Bladt, et al.** (1995). "Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development." Nature **373**(6516): 699-702.
- Schmidt, M., K. Paes, et al.** (2007). "EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution." Development **134**(16): 2913-23.
- Schoumacher, M., R. D. Goldman, et al.** "Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia." J Cell Biol **189**(3): 541-56.
- Seki, T., M. Hagiya, et al.** (1991). "Organization of the human hepatocyte growth factor-encoding gene." Gene **102**(2): 213-9.
- Sell, S.** (2002). "Cellular origin of hepatocellular carcinomas." Semin Cell Dev Biol **13**(6): 419-24.

- Sengupta, S., E. Gherardi, et al.** (2003). "Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(1): 69-75.
- Shafritz, D. A., M. Oertel, et al.** (2006). "Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells." Hepatology **43**(2 Suppl 1): S89-98.
- Shimomura, T., J. Kondo, et al.** (1993). "Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin." J Biol Chem **268**(30): 22927-32.
- Shiota, G., T. Kunisada, et al.** (2000). "In vivo transfer of hepatocyte growth factor gene accelerates proliferation of hepatic oval cells in a 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model in rats." FEBS Lett **470**(3): 325-30.
- Sipeki, S., E. Bander, et al.** (1999). "Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to Erk1/Erk2 MAP kinase activation associated with hepatocyte growth factor-induced cell scattering." Cell Signal **11**(12): 885-90.
- Sonnenberg, E., D. Meyer, et al.** (1993). "Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development." J Cell Biol **123**(1): 223-35.
- Spear, B. T., L. Jin, et al.** (2006). "Transcriptional control in the mammalian liver: liver development, perinatal repression, and zonal gene regulation." Cell Mol Life Sci **63**(24): 2922-38.
- Stamos, J., R. A. Lazarus, et al.** (2004). "Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor." EMBO J **23**(12): 2325-35.
- Stella, M. C. and P. M. Comoglio** (1999). "HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering." Int J Biochem Cell Biol **31**(12): 1357-62.
- Stella, M. C. and P. M. Comoglio** (1999). "HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering." Int J Biochem Cell Biol **31**(12): 1357-62.
- Stoker, M., E. Gherardi, et al.** (1987). "Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility." Nature **327**(6119): 239-42.
- Stoker, M., E. Gherardi, et al.** (1987). "Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility." Nature **327**(6119): 239-42.
- Stuart, K. A., S. M. Riordan, et al.** (2000). "Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling." Int J Exp Pathol **81**(1): 17-30.
- Tanaka, M., T. Itoh, et al.** (2011) "Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms." J Biochem **149**(3): 231-9.
- Thiery, J. P.** (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Thiery, J. P.** (2003). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 740-6.

- Thiery, J. P. and J. P. Sleeman** (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-42.
- Thompson, E. W. and E. D. Williams** (2008). "EMT and MET in carcinoma--clinical observations, regulatory pathways and new models." Clin Exp Metastasis **25**(6): 591-2.
- Tirnitz-Parker, J. E., C. S. Viebahn, et al.** "Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is a mitogen for liver progenitor cells." Hepatology **52**(1): 291-302.
- Trusolino, L., A. Bertotti, et al.** (2010)"MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 834-48.
- Tulasne, D. and B. Foveau** (2008). "The shadow of death on the MET tyrosine kinase receptor." Cell Death Differ **15**(3): 427-34.
- Tulasne, D., J. Deheuninck, et al.** (2004). "Proapoptotic function of the MET tyrosine kinase receptor through caspase cleavage." Mol Cell Biol **24**(23): 10328-39.
- Uehara, Y., O. Minowa, et al.** (1995). "Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor." Nature **373**(6516): 702-5.
- Ueki, T., Y. Kaneda, et al.** (1999). "Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats." Nat Med **5**(2): 226-30.
- Uemura, T., H. Oda, et al.** (1996). "Zygotic Drosophila E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the Drosophila embryo." Genes Dev **10**(6): 659-71.
- Valdes, F., A. M. Alvarez, et al.** (2002). "The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor Beta in fetal rat hepatocytes." Mol Cancer Res **1**(1): 68-78.
- Valverde, A. M., D. J. Burks, et al.** (2003). "Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes." Diabetes **52**(9): 2239-48.
- Valverde, A. M., D. J. Burks, et al.** (2003). "Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes." Diabetes **52**(9): 2239-48.
- van Meer, G. and K. Simons** (1988). "Lipid polarity and sorting in epithelial cells." J Cell Biochem **36**(1): 51-8.
- Vande Woude, G. F., M. Jeffers, et al.** (1997). "Met-HGF/SF: tumorigenesis, invasion and metastasis." Ciba Found Symp **212**: 119-30; discussion 130-2, 148-54.
- Vaughan, R. B. and J. P. Trinkaus** (1966). "Movements of epithelial cell sheets in vitro." J Cell Sci **1**(4): 407-13.
- Viebahn, C. S. and G. C. Yeoh** (2008). "What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury." Int J Biochem Cell Biol **40**(5): 855-73.
- Vitorino, P. and T. Meyer** (2008). "Modular control of endothelial sheet migration." Genes Dev **22**(23): 3268-81.

- Vivanco, I. and C. L. Sawyers** (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer **2**(7): 489-501.
- Wang, F., P. Herzmark, et al.** (2002). "Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils." Nat Cell Biol **4**(7): 513-8.
- Wang, X., M. Foster, et al.** (2003). "The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100 Suppl 1**: 11881-8.
- Weidner, K. M., N. Arakaki, et al.** (1991). "Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7001-5.
- Weijer, C. J.** 2009. Collective cell migration in development. J Cell Sci **122** (Pt 18):3215-3223.
- Weisberg, E., M. Sattler, et al.** (1997). "Role of focal adhesion proteins in signal transduction and oncogenesis." Crit Rev Oncog **8**(4): 343-58.
- Wicki, A., F. Lehenbre, N. Wick, B. Hantusch, D. Kerjaschki, and G. Christofori. 2006. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. Cancer Cell **9** (4):261-272.
- Willis, B. C., J. M. Liebler, et al.** (2005). "Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis." Am J Pathol **166**(5): 1321-32.
- Yang, J. and R. A. Weinberg** (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." Dev Cell **14**(6): 818-29.
- Yang, W., H. X. Yan, et al.** (2008). "Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells." Cancer Res **68**(11): 4287-95.
- Yang, W., H. X. Yan, L. Chen, Q. Liu, Y. Q. He, L. X. Yu, S. H. Zhang, D. D. Huang, L. Tang, X. N. Kong, C. Chen, S. Q. Liu, M. C. Wu, and H. Y. Wang.** 2008. Wnt/beta-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. Cancer Res **68** (11):4287-4295.
- Yang, X. M. and M. Park** (1995). "Expression of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor tyrosine kinase is localized to epithelia in the adult mouse." Lab Invest **73**(4): 483-91.
- Yokoyama, S., K. Tachibana, et al.** (2001). "alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin." Mol Biol Cell **12**(6): 1595-609.
- Yovchev, M. I., J. Zhang, et al.** (2009). "Thymus cell antigen-1-expressing cells in the oval cell compartment." Hepatology **50**(2): 601-11.
- Yovchev, M. I., P. N. Grozdanov, B. Joseph, S. Gupta, and M. D. Dabeva.** 2007. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. Hepatology **45** (1):139-149.
- Yovchev, M. I., P. N. Grozdanov, et al.** (2008). "Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver." Hepatology **47**(2): 636-47.
- Zarnegar, R.** (1995). "Regulation of HGF and HGFR gene expression." EXS **74**: 33-49.

**Zarnegar, R., B. Petersen, et al.** (1992). "Localization of hepatocyte growth factor (HGF) gene on human chromosome 7." Genomics **12**(1): 147-50.

**Zhang, Y. W. and G. F. Vande Woude** (2003). "HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion." J Cell Biochem **88**(2): 408-17.

**Zheng, Y. W. and H. Taniguchi** (2003). "Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver." Semin Liver Dis **23**(4): 337-48.

**Zioncheck, T. F., L. Richardson, et al.** (1995). "Sulfated oligosaccharides promote hepatocyte growth factor association and govern its mitogenic activity." J Biol Chem **270**(28): 16871-8.

## **ANEXO I**



**ANEXO I. Tabla de los genes utilizados en el *array* de Moléculas de Adhesión y Matriz Extracelular**

<b>GeneBank</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Descripción</b>	<b>Nombre del GEN</b>
NM_009621	Adamts1	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAM-TS1, ADAMTS, ADAMTS-1, C3-C5, METH-1, METH1
NM_175643	Adamts2	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	4732482M10, A430089F14, ADAM-TS2, ADAMTS-3, KIAA4060, PCINP, hPCPNI, mKIAA4060
NM_011782	Adamts5	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	9530092O11Rik, ADAM-TS5, ADAMTS1, ADAMTS11, AI481094, ASMP-2
NM_013906	Adamts8	A disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	METH-2, METH2
NM_009818	Ctnna1	Catenin (cadherin associated protein), alpha 1	2010010M04Rik, AA517462, AI988031, Catna1
NM_009819	Ctnna2	Catenin (cadherin associated protein), alpha 2	AI481747, Catna, Catna2, cdf, chp
NM_007614	Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	Bfc, Ccatnb, Mesc
NM_009851	Cd44	CD44 antigen	AU023126, AW121933, AW146109, HERMES, Ly-24, Pgp-1
NM_009864	Cdh1	Cadherin 1	AA960649, Ecad, L-CAM, MGC107495, UVO, Um
NM_007664	Cdh2	Cadherin 2	CDHN, N-cadherin, Ncad
NM_001037809	Cdh3	Cadherin 3	AI385538, Cadp, P-cadherin, Pcad
NM_009867	Cdh4	Cadherin 4	AW120700, R-cadherin, Rcad
NM_007727	Cntn1	Contactin 1	AW495098, CNTN, F3cam
NM_007742	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	Col1a-1, Cola-1, Cola1, Mov-13, Mov13
NM_031163	Col2a1	Collagen, type II, alpha 1	Col2, Col2a, Col2a-1, Del1, Dmm, M100856, MGC90638, Rgsc856
NM_009930	Col3a1	Collagen, type III, alpha 1	AW550625, Col3a-1, KIAA4231, MMS10-W, Ms10w, mKIAA4231



NM_010493 GeneBank	Icam1 Símbolo	Intercellular adhesion molecule 1 Descripción	CD54, Icam-1, Ly-47, MALA-2, MGC6195 Nombre del GEN
NM_009931	Col4a1	Collagen, type IV, alpha 1	Bru, Col4a-1, Del(8)44H, Raw, Sve
NM_009932	Col4a2	Collagen, type IV, alpha 2	Col4a-2, MGC7371
NM_007734	Col4a3	Collagen, type IV, alpha 3	[a]3(IV), alpha3(IV)
NM_015734	Col5a1	Collagen, type V, alpha 1	AI413331
NM_009933	Col6a1	Collagen, type VI, alpha 1	AI747156, Col6a-1
NM_001081249	Vcan	Versican	5430420N07Rik, 9430051N09, Cspg2, DPEAAE, NG2, PG-M, PG-M(V0), PG-M(V1), hdf
NM_010217	Ctgf	Connective tissue growth factor	Ccn2, Fisp12, Hcs24, fisp-12
NM_007899	Ecm1	Extracellular matrix protein 1	AI663821, p85
NM_133918	Emilin1	Elastin microfibril interfacer 1	5830419M17Rik, AW229038, BB105748, EMILIN-1, gp115
NM_009848	Entpd1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	2610206B08Rik, AA408691, Cd39, NTPDase-1
NM_010180	Fbln1	Fibulin 1	-
NM_010233	Fn1	Fibronectin 1	E330027109, Fn, Fn-1, MGC117493
NM_013500	Hapln1	Hyaluronan and proteoglycan link protein 1	BB099155, CLP, Crt11, Crt11I, LP, LP-1
NM_010406	Hc	Hemolytic complement	C5, C5a, He

GeneBank	Simbolo	Descripción	Nombre del GEN
NM_010954	Ncam2	Neural cell adhesion molecule 2	Ncam-2, Ocam, RNCAM
NM_008816	Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	C85791, Cd31, MGC102160, PECAM-1, Pecam
NM_015784	Postn	Periostin, osteoblast specific factor	A630052E07Rik, A1747096, OSF-2, Osf2, PLF, PN, peri
NM_011345	Sele	Selectin, endothelial cell	CD62E, E-selectin, Elam
NM_011346	Sell	Selectin, lymphocyte	AI528707, CD62L, L-selectin, LECAM-1, Lnh, Ly-22, Ly-m22, Lyam-1, Lyam1
NM_011347	Selp	Selectin, platelet	CD62P, GMP-140, Grmp, LECAM3, MGC129336, MGC129337, PADGEM
NM_011360	Sgce	Sarcoglycan, epsilon	e-SG
NM_009242	Sparc	Secreted acidic cysteine rich glycoprotein	AA517111, BM-40
NM_009262	Spock1	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1	Spock, Tcn1, testican
NM_009263	Spp1	Secreted phosphoprotein 1	2AR, Apl-1, BNSP, BSPI, Bsp, ETA-1, Eta, OP, Opn, Opnl, Ric, Spp-1
NM_009306	Syt1	Synaptotagmin I	AW124717, G630098F17Rik
NM_009369	Tgfb1	Transforming growth factor, beta induced	68kDa, A1181842, A1747162, Beta-ig, MGC150270, big-h3
NM_011580	Thbs1	Thrombospondin 1	TSP-1, TSP1, Thbs-1, tbsp1
NM_011581	Thbs2	Thrombospondin 2	TSP2, Thbs-2

GeneBank	Símbolo	Descripción	Nombre del GEN
NM_011594	Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2	D11Bwg1104e, Timp-2
NM_011595	Timp3	Tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp-3
NM_011607	Tnc	Tenascin C	AI528729, C130033P17Rik, Hxb, MGC144208, MGC144209, TN, TN-C, Ten, cytotactin, tenascin-C
NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	CD106, Vcam-1
NM_011707	Vtn	Vitronectin	AI256434, Vn
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	AI747421, Gur, Gus, Gus-r, Gus-s, Gus-t, Gus-u, Gut, asd, g
NM_013556	Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	C81579, HPGRT, Hprt1, MGC103149
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa, AL022974, C81438, Hsp84, Hsp84-1, Hsp90, Hspcb, MGC115780